

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de dos nuevos fungicidas sistémicos y ensayos de  
tolerancia al benomyl en el "Mal Secco" de los agrios**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Inmaculada Giménez Verdú**

**Madrid, 2015**

Inmaculada Giménez Verdú

TF  
1981  
133



x 52-0/1 1981-0

ESTUDIO DE DOS NUEVOS FUNGICIDAS SISTEMICOS Y ENSAYOS  
DE TOLERANCIA AL BENOMYL EN EL "MAL SECCO" DE LOS AGRIOS

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1981



BIBLIOTECA

© Inmaculada Giménez Verdú  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-15915-1981

ESTUDIO DE DOS NUEVOS FUNGICIDAS SISTEMICOS  
Y ENSAYOS DE TOLERANCIA AL BENOMYL EN  
EL "MAL SECCO" DE LOS AGRIOS

Tesis que presenta I. GIMENEZ VERDU para  
optar al grado de Doctor en C. Biologicas

Diciembre de 1.978

Ponente : C. VICENTE CORDOBA  
Director : M. SALERNO

FACULTAD DE C. BIOLOGICAS . UNIV . COMPLUTENSE MADRID



Especial gratitud al Prof. C. VICENTE CORDOBA  
Decano de esta Facultad , por aceptar la Ponencia  
de esta Tesis.

Este estudio fue posible gracias a una beca del INIA  
/BIRF , concedida por el IRI Research Instituto ,  
New York. USA



Agradezco al Prof. E. LABORDA , que dirige  
la Seccion de Fitopatologia y Proteccion Vegetal , en el Ins-  
tituto de Edafologia y Biologia Vegetal del C.S.I.C. Madrid,  
haber iniciado bajo su direccion esta linea de investigacion.





## INDICE GENERAL



	<u>Pags.</u>
INTRODUCCION .....	1
1.- ESTADO ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS	
SOBRE EL "MAL SECCO" DE LOS AGRIOS ....	5
1.1. Historia y distribución.....	6
1.2. Etiología .....	8
1.2.1. <u>P. tracheiphila</u> .....	8
1.2.2. Líneas y razas. ....	10
1.3. Sintomatología .....	12
1.4. Procesos de infección .....	21
1.4.1. Infección por vía hipógea. ....	21
1.4.2. Infección por vía epígea. ....	24
1.4.3. Infección por los frutos.....	25
1.5. Fuentes y velocidad de contaminación.....	26
1.5.1. Fuentes de contaminación.....	26
1.5.2. Velocidad de infección.....	26
1.6. Acción del hongo y reacción del huésped, ....	27
1.6.1. Acción del hongo.....	27
1.6.1.1. Pigmentos producidos por el hongo.....	27
1.6.1.2. Actividades enzimáticas - del hongo.....	30
1.6.1.3. Actividades tóxicas del hongo.....	32
1.6.2. Reacción del huésped.....	37
1.6.3. Interrelación hongo-virus, .....	40
1.7. Ecología.....	42
1.7.1. Condiciones generales.....	42
1.7.2. Condiciones que favorecen la infección o predisposición .....	45
1.8. Resistencia y sensibilidad específica.....	48
1.8.1. Susceptibilidad y resistencia en casos de infección por vía epígea.....	49

1.8.1.1. Susceptibilidad y resistencia de las especies de mayor interés comercial: limo- nero, pomelo, naranjo dulce, mandarino, bergamote, cidro, naranjilla china y na- ranjo amargo.....	50
1.8.1.2. Susceptibilidad y resistencia de otras especies del - género Citrus.....	57
1.8.1.3. Susceptibilidad y resistencia en especies no pertenecientes al género Citrus. ....	59
1.8.1.4. Híbridos diversos.....	60
1.8.2. Susceptibilidad y resistencia en casos de infección por vía hipógea.....	61
1.8.3. Otras experiencias sobre resistencia en cítricos al <u>P. tracheiphila</u> .....	62
1.9. Terapéutica .....	69
1.9.1. Métodos preventivos .....	69
1.9.2. Métodos curativos. Terapéutica externa e interna.....	72
1.9.3. Otros ensayos sobre el control de <u>P. tracheiphila</u> .....	80
.....	
1.11 Características generales del "mal secco" .....	90
2.- ESTUDIO DE DOS NUEVOS FUNGICIDAS SISTEMICOS .....	94
2.1. Pruebas "in vitro" sobre la actividad de los productos frente al crecimiento de colonias de <u>P. tracheiphila</u> y otros hongos.....	98
2.1.1. Aplicación del fungicida directamente sobre la superficie de sustrato. ....	99
2.1.2. Aplicación del fungicida en el interior del sustrato por inyección, .....	100

2.1.3. Aplicación del fungicida incluido en el sustrato.....	102
2.2. Pruebas en cámara climática.....	106
2.2.1. Ensayos de fitotoxicidad.....	107
2.2.2. Ensayos de sistemicidad de los productos.....	109
2.2.2.1. 1ª Prueba (de carácter preliminar): Aplicación de los productos en suspensión acuosa y tratamiento foliar y al terreno.....	114
2.2.2.2. 2ª Prueba: Aplicación de los productos en suspensión acuosa y tratamiento foliar y al terreno.....	115
2.2.2.3. 3ª Prueba: Aplicación de los productos en tratamiento foliar, en suspensión acuosa, o con la adición de aceites auxiliares.....	123
2.2.3. Ensayos de control de los productos en el desarrollo de la enfermedad.....	128
2.2.3.1. 1ª Prueba de control: Aplicación de los productos en suspensión acuosa y tratamiento foliar y al terreno.....	131
2.2.3.2. 2ª Prueba de control: Aplicación de los productos en tratamiento foliar y suspensión acuosa, o, con adición de aceites auxiliares.....	137
2.3. Discusión.....	141
3. ENSAYOS DE TOLERANCIA AL BENOMYL EN CEPAS DE P. TRACHEIPHILA .....	146
3.1. Material y métodos.....	150

3.2. Descripción de las pruebas y resultados,.....	152
3.2.1. Pruebas preliminares,.....	152
3.2.2. 1ª Prueba de tolerancia.....	154
3.2.3. 2ª Prueba de tolerancia.....	158
3.2.4. 3ª Prueba de tolerancia.....	164
3.2.5. 4ª Prueba: Observación de la acción fungistática o fungicida del producto en cepas sensibles de <u>P.tracheiphila</u> , provenientes de capos tratados y no tratados,.....	168
3.3. Discusión.....	171
CONCLUSIONES .....	175
RESUMEN .....	179
BIBLIOGRAFIA .....	181

## INTRODUCCION



El "mal secco" es una enfermedad frecuente en los cítricos de la Cuenca del Mediterráneo, causada por el hongo Deuteromiceto Phoma tracheiphila (Petri) Kanc. et Chick., que fué descubierto a fines del siglo pasado y se ha ido extendiendo del este al oeste de la Cuenca.

Se caracteriza por una traqueomicosis que afecta especialmente el limonero (Citrus limon Burm.), originando pérdidas sensibles en el rendimiento de este cultivo.

En Italia, según SALERNO et al. (1.976) y CUTULI y SALERNO (1.976), el "mal secco" en el pasado era controlado en cierto modo con inspecciones periódicas y podas. Tales intervenciones de poda-que aunque en menor cuantía se vienen todavía realizando-unido al hecho de que los agricultores, con objeto de reducir la gravedad de la enfermedad limitaban el vigor de la planta reduciendo el abonado especialmente de tipo nitrogenado, y a su recrudescimiento relacionado a fenómenos meteorológicos adversos (especialmente granizo), han ocasionado en los últimos años grandes daños en la producción con grandes repercusiones de tipo económico. Tales daños han sido calculados en una reducción media de producción de 200 q/Ha, cuando en zonas no afectadas se puede llegar a una producción de 600-800 q/Ha. Se calcula que el "mal secco" origina una reducción anual de la producción valorada aproximadamente en 10.000 millones de pesetas.

Según datos de RUGGIERI (1.953 e) en Sicilia, en el periodo 1.918 - 1.953, se calculan 12.000 Ha. de limoneros destruidos o --

gravemente afectados.

Cabe citar asimismo los daños producidos por la enfermedad en Turquía, y en la U.R.S.S. en los agrios del litoral de Georgia, en el Mar Negro.

En la actualidad, España y Marruecos son los dos únicos países de la Cuenca Mediterránea en los que no parece existir el "mal secco", aunque LABORDA y SANCHEZ (1.973) aportan datos sobre su posible presencia en la región de la Plana, (Castellón, España). En todo caso, es obvio que debe mantenerse una estrecha vigilancia para detectar cualquier síntoma de la enfermedad.

Así pues, dado el avance de la enfermedad en los distintos países mediterráneos y ante la posibilidad de su extensión en España, se proyectó la realización de este trabajo concerniente a un estudio profundo del "mal secco" y su control, lo que fué posible por las relaciones existentes entre la Sección de Fitopatología y Protección Vegetal del Instituto de Edafología y Biología Vegetal y el "Istituto di Patologia Vegetale" de Bari (Italia).

El contenido de este trabajo se puede considerar dividido en tres partes:

- 1.- Estado actual de los estudios sobre el "mal secco" de los agrios.
- 2.- Estudio de dos nuevos fungicidas sistémicos: Triforina y Thiocur.

3.- Ensayos sobre la eventual aparición de fenómenos de tolerancia al Benomyl en cepas de P. tracheiphila.

La primera parte, está integrada por una revisión de los trabajos realizados sobre la enfermedad, clasificados en una serie de apartados en orden a la naturaleza de su estudio.

En la segunda parte, se recogen una serie de ensayos "in vitro" y en cámara climática, encaminados a determinar la eficacia de la Triforina y Thiocur en el control de la enfermedad. Para conseguir una mayor precisión en los resultados, estos han sido comparados con los de otro fungicida sistémico, el Benomyl, de actividad conocida.

La tercera parte del trabajo está orientada a evidenciar el efecto de sucesivos tratamientos con Benomyl en campo, sobre la sensibilidad de diferentes poblaciones del patógeno.

5

ESTADO ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS  
SOBRE EL "MAL SECCO" DE LOS AGRIOS

Los estudios realizados sobre la enfermedad, se engloban en los siguientes apartados:

- 1.1. Historia y distribución
- 1.2. Etiología
- 1.3. Sintomatología
- 1.4. Procesos de infección
- 1.5. Fuentes y velocidad de contaminación
- 1.6. Acción del hongo y reacción del huésped
- 1.7. Ecología
- 1.8. Terapéutica
- 1.9. Tolerancia

#### 1.1. Historia y distribución

La enfermedad parece iniciarse en las islas griegas del Mar Egeo, particularmente en Quios y Paros, por lo que se la denominaba "enfermedad de Paros"

Hacia 1.916, se observa en Sicilia, en las cercanías de Mesina, de donde se propagó a Catania, Siracusa y Palermo. En Calabria se cree que aparece en 1.920.

SAREJANNI (1.939) la señala en Creta, Eubea y Tesalia

Según PETRI (1.940), de Quios y Paros la enfermedad pasó al Peloponeso. Asimismo, ha sido observada en Palestina, Chipre

y Turquía, GASSNER (1.940), y de igual modo en Siria, Rivera ligura y Costa Azul francesa.

RUGGIERI (1.947) la describe en el Lacio en Fondi (Italia)

BALDACCI y GAROFALO (1.949) señalan la existencia de "mal secco" en mandarinos de 25 años de edad en Conca d'Oro, cerca de Palermo (Sicilia).

En el periodo 1.952 - 1.953, CROSSA-RAYNAUD (1.960 b) la identifica en Argelia y Túnez.

GRANITI (1.962) la identifica en Puglia, en limoneros de Massafra y en limoneros y naranjos amargos cerca de Chiatona (Italia)

GORLENKO (1.963), la describe en el Cáucaso. TRAMIER y MERCIER (1.963) en Menton (Francia). Este mismo año, FODDAI y MARRAS (1.963) describen la raza no cromógena en limoneros de Cerdeña.

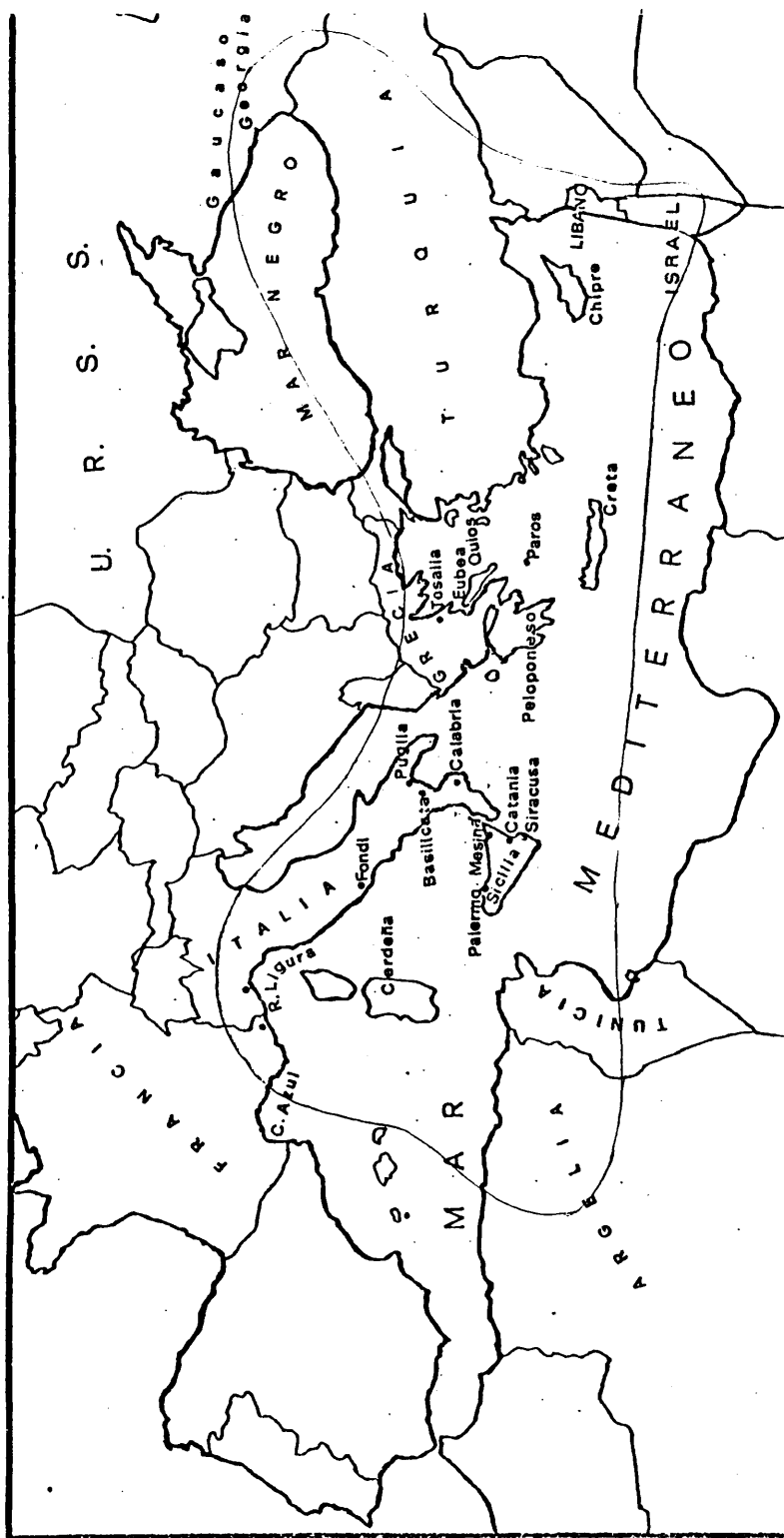
KNORR y VAUGHN (1.964) la citan en dos localidades sirias, si bien la consideran de escaso interés.

KNORR (1.965), describe el "mal secco" por primera vez en cítricos de Florida. (errata).

DE CICCIO y LUISI (1.976) observan la presencia de la enfermedad en Basilicata (Italia).

(1). Distribución geográfica del "mal secco".

(1) Distribución geográfica del "mal secco".



## 1.2. Etiología

1.2.1. El hongo. - La enfermedad ha recibido diversas denominaciones, entre ellas: "desecamiento infeccioso", "gomosis seca" y "marchitamiento infeccioso", que hoy están en desuso, adoptándose la de "mal secco" debida a L.SAVASTANO, salvo en Turquía, donde se denomina "kurutan".

En Italia se consideró al principio como un desequilibrio de los agrios y otros frutales causado por la bacteria Phytomonas syringae Van Hall, SAVASTANO (1.921 y 1.923), agente del "blast" -- con que el "mal secco" había sido confundido. PETRI (1.926 ab, 1.927 b, 1.929 a) considera al Colletotricum gloeosporoides Penzig como -- agente de la enfermedad.

PETRI (1.929b) indica que el "mal secco" típico se manifiesta casi exclusivamente en limoneros, mientras la "antracnosis" -- aparece en casi todas las especies de cítricos, describiendo un hongo como agente causal del "mal secco", PETRI (1.929 b) y lo considera un género y especie nueva, que denomina Deuterophoma tracheiphila. Esta hipótesis ha sido confirmada por PETRI (1.930 c e f) y otros autores, SAVASTANO y FAWCET (1.930), CARRANTE y RUGGIERI, (1.947)

Entre las polémicas que promovió la proposición de este agente cabe citar, la hipótesis que consideraba al "mal secco" una naturaleza viral; GASSNER (1.940), atribuyó la enfermedad al Phoma limonis siendo refutado por PETRI (1.940); PASINETTI (1.952) ex-



cluye la existencia de un agente patógeno, atribuyendo la enfermedad a una insuficiencia de funcionamiento del aparato circulatorio, niega incluso la existencia del Deuterophoma tracheiphila y considera el Colletotricum gloeosporoides sinónimo de Phoma limonis, teoría negada por GOIDANICH y RUGGIERI (1.953).

De igual modo, la creación del nuevo género y especie - originaron varias discusiones, destacando la que motivó la creación - del nuevo género Blastophoma por H. KLEBAHN, PETRI (1.934 b).

CIFERRI (1.946) señala que la descripción del género Deuterophoma coincide con la del género Bakerophoma Diedicke y propone la combinación Bakerophoma tracheiphila Petri.

GOIDANICH Y RUGGIERI (1.947 b) confirmaron la idea de Petri, distinguiendo en la Phomaceas dos familias: Phomaceas y Deuterophomaceas, proponiendo la creación de dos subfamilias Peyronellaceas y Sclerophomaceas, así como de un nuevo género Deuterophomina próximo al género Peyronellaea. Más tarde, intentaron aproximar Deuterophoma tracheiphila a Dothiorella ulmi, proponiendo la combinación Deuterophoma ulmi.

Tras estas acepciones, queda ya prácticamente establecido el Deuterophoma tracheiphila como causante del "mal secco".

Posteriormente hay que señalar los estudios de CICCARONE y RUSSO (1.969) sobre sistemática y morfología. Asimismo, CICCARONE (1.971) realiza una descripción del hongo y justifica el

cambio de Deuterophoma a Phoma. PUNITHALINGAN et HOLLI DAY (1.973) hacen una descripción del hongo.

Otros agentes patógenos que producen en los agrios alteraciones similares son: Verticillium albo-atrum Reinke y Berth, que según RUGGIERI (1946 a) puede originar traqueomicosis. CHAPOT (1.963) cita la bacteria Phytophthora syringae Van Hall agente de la "bacteriosis" y el Colletotricum gloeosporoides causante de la antracnosis. Estas dos enfermedades se presentan frecuentemente -- asociadas al "mal secco" en casi todos los países en que éste ha sido citado, así lo indican BALDACCI y GAROFALO (1.950) en Italia, REICHERT y CHORIN (1.956) en Israel, etc.. En Turquía, CHAPOT (1.963) señala en limoneros Deuterophoma tracheiphila asociado con bacteriosis, especialmente en la región del Dalaman.

En U.R.S.S., SCHUMAKOVA y GRUBE (1.957), observan Epicoccum granulatum Penzig en plantaciones con "mal secco".

1.2.2. Líneas y razas. -- PETRI (1.930 b, 1.930 e) fué el primero que mantuvo la idea de la existencia en la naturaleza de dos razas de P. tracheiphila. BALDACCI (1.950) indica las dos razas con las siglas "DPR" (colonias con micelio demaciaceo, que producen picnidios y pigmento rojo), y "DP" (colonias con micelio demaciaceo, que producen picnidios pero no pigmento rojo). Existe otra raza "R" (colonias sin micelio demaciaceo ni picnidios y muy

pigmentadas en rojo) que se obtiene en cultivo por separación de seg lóres.

Se ha observado que la raza "DPR" está presente en todas las zonas donde ha sido identificada la enfermedad. La raza "DP" presenta menor grado de patogenicidad, PETRI (1930 e) y SCR VANI (1.954).

La raza cromógena "DPR", produce una coloración - rosa o roja en el leño infectado.

Petri emitió la idea de que el pigmento ocasionaba - una acción toxica sobre las células cambiales. QUILICO et al. (1.952) realizaron estudios sobre el pigmento y los productos metabólicos del micelio. BUGIANI, et al. (1.959) consideran que la coloración de la madera infectada parece ser el resultado de una materia gomosa y que el pigmento rojo que aparece "in vitro", no se observa "in vivo" cuando el micelio permanece hialino.

Respecto a la distribución de las razas, en Grecia -- existen "DPR" y "DP", PETRI (1.930 e) y SAREJANNI (1.935). En Sicilia se conoce solamente la cromógena. SALERNO y PERROTA (1.966) estudiaron los caracteres de cultivo y patogénicos de poblacio nes sicilianas del hongo, observando, que si bien todas las cepas producían pigmento rojo y fluidificaban la gelatina a peptona, -de lo que se deduce que pertenecían a la raza "DPR"-, la medida de los conidi-- dios y fialoconidios eran muy cercanos a los de la raza "DP". En

cuanto a la patogenicidad de las cepas, observaron que existía una mayor virulencia en las cepas con fialoconidios más alargados.

FODDAI y MARRAS (1.963) observaron por primera vez en limoneros de Cerdeña la enfermedad producida por la raza no cromógena, señalando que los conidios se diferenciaban de los de la raza siciliana en que presentaban una longitud de hasta 4 micras.

En Israel, parece que concurren ambas razas

### 1.3. Sintomatología

Como suele ocurrir en todas las traqueomicosis, los síntomas externos producidos por el "mal secco", no aparecen hasta que es invadido el sistema vascular de forma más o menos abundante, lo que lleva consigo un transcurso de tiempo más o menos largo. Por otra parte, la mayor o menor rapidez de aparición de los síntomas sobre las partes distales del árbol depende del emplazamiento de la infección, GOIDANICH (1.949). No obstante, cabe señalar que los síntomas externos de esta enfermedad no son específicos de la misma, ya que son comunes a otras alteraciones de diversos orígenes producidos por una inadecuada nutrición de los frondes; gomosis de Phytophthora, diversas podredumbres, descortezamientos variados y antracnosis, sin contar las manifestaciones debidas a heladas, vientos, etc.

De igual forma, la sintomatología de la "fusiarosis", producida por Fusarium laterinium Nees, detectada y estudiada en

12 bis



Fot. 1 .- Plantas de lomonero "Monachello" con síntomas de "mal secco".

Italia por SALERNO 61.959) sobre naranjo amargo y limonero injertado en naranjo amargo y posteriormente en España por GIMENEZ (trabajo pendiente de publicacion) en naranjos de Castellon de la Plana , puede ser confundida con la del "mal secco" .

Acerca del estudio sintomatologico de la enfermedad , figuran trabajos de PETRI (1.927 b) que no hace distincion entre los sintomas de bacteriosis y antracnosis , FAWCETT (1.936) , CAsella (1.935) y CARRANTE (1.938).

En el "mal secco" , las hojas de las pequeñas ramas que forman la copa del arbol , o las de una rama principal se marchitan , decoloran y desecan . La parte afectada alcanza raramente la totalidad de los frondes y frecuentemente solo afecta a una parte del arbol . Las ramitas que derivan de la rama se desecan , las hojas muertas quedan fijadas al árbol o caen , segun las condiciones climaticas (humedad y viento) y la rapidez de propagacion de la enfermedad . El desecamiento sigue hacia el tronco del arbol extendiendose a su vez hacia las ramas que no han sido todavia alcanzadas . Las ramas pueden mostrar bandas mas o menos anchas de color castaño . Asimismo , bajo la epidermis se forman caracteristicos cuerpos fructiferos denominados "picnidios" -determinando masas grisáceas - que luego explotan. (Fot. 2 y 3).

Los "picnidios" tienen forma de globosa a lenticular .



Fot. 2 .- Rama de naranjo amargo mostrando picnidios que  
afloran sobre la superficie de la epidermis al la  
cerar con su cuello la corteza.

13<sup>2</sup>



Fot. 3 .- Picnidio de P. tracheiphila aislado de una rama infectada de limonero.



son negros , midiendo de 100 - 180 u de diámetro ; su pared esta constituida de diversas celulas : al externo de celulas esclerotizadas y densamente pigmentadas, y al interno de celulas pseudoparenquimaticas , con pared sutil e hialina . Las células "conidiógenas" son enteroblásticas , fialidicas , hialinas , simples , ampuliformes , dispuestas alineadas revistiendo completamente la cavidad interna del picnidio . Los "picoconidios " se producen por un proceso simile a una gemacion , y son hialinos , unicelulares , rectos o curvados , con extremos redondeados , midiendo de 2 - 3 x 1 u (PUNITHALINGAM y HOLLIDAY , 1.973).

Los picoconidios son expulsados a traves de un ostiolo situado en la extremidad del cuello del picnidio , agrupados en masas cirrosas , pudiendo ser transportados desde alli mediante el agua de lluvia o por insectos . Mas sencillo es todabia el transporte anemofilo de picnidios enteros que se liberan de otoño en adelante por deshorganizacion y rotura de los tejidos corticales de las ramitas desecadas .

GRANITI (1.963) cita la presencia de picnidios sobre organos foliares , observandoles sobre las estipulas de hojas de plantones de naranjo amargo inoculados en camara climática.

En los casos graves de "mal secco" , el arbol muere en el peridodo de uno o dos años.

Si se secciona tangencialmente o en bisel la parte todavía verde de una rama , cuya extremidad está desecada , se observa generalmente en la madera una coloración salmón o rojo zanahoria muy característica , considerada por SAVASTANO y FAWCETT (1.930) como una buena indicación de la presencia del patógeno. ( Fot. 4 ).

RUGGERI (1.946) , describe la enfermedad y su efecto sobre el crecimiento de los cítricos sicilianos , considerando la enfermedad de enorme gravedad.

Diversas alteraciones producen coloraciones parecidas en la madera , BITANCOURT , citado por FAWCETT (1.936) , las encontró sobre cítricos afectados por rayos . En Italia , SALTERNO (1.959) observó en la "fusariosis" causadas por Fusarium lateritium Ness , una coloración naranja de la madera , asimismo encontrada en España por GIMENEZ (trabajo pendiente de publicación) De igual forma , CHAPOT y DELUCCHI (1.963) y VANDERWEYEN (1.963) señalan haberla encontrado en jóvenes plantas de naranjo amargo y Poncirus trifoliata afectados de "sand burn" , pero la coloración longitudinal de la madera se presentaba especialmente en finas líneas paralelas ( haces fivro - vasculares ) , de gran semejanza con las presentadas en el "mal secco".

En el " mal secco" esta coloración rosa o roja de la madera no aparece hasta un estado bastante avanzado de la enfermedad .

Dicha coloracion , no obstante , puede ser obtenida artificialmente de forma precoz , por la técnica de ORCHANSKAYA (1.952 , 1.953 y 1.955) que permite evidenciar en el leño infectado una coloracion rosácea o amarillo anaranjada , aplicando sobre el mismo una solución al 1 % de sosa cáustica (Na OH) , o potásica (K OH) . BAZZI y SCRIVANI (1.953) pasaban sobre la medera descortezada un trozo de algodón impregnado en alcohol , a continuación , una vez seco , dejaban caer unas gotas de amoniaco al 10 % , la madera no infectada se coloreaba de amarillo verdoso y la afectada de naranja . Esta coloración artificial es útil para realizar un diagnóstico rápido de la infección.

FEDORINTCHIK (1.953 c) señala como diagnosis temprana la aparicion de una coloracion rojo zanahoria en los cortes del leño infectado en unión de síntomas externos , indicando que dicha coloración se acentua mediante una solución de sosa cáustica al 20 % . Este método seguido de la poda de las partes afectadas se aplicó en 1.952 en el area de Batum , siendo a efectos prácticos eliminada la enfermedad.

PETRI (1.930) fué quien primero sugirió que los metabolitos toxicos excretados por el hongo estaban implicados en la patogénesis . SHUMAKOVA (1.964) al estudiar las características de aparición de síntomas de "mal secco" y sus causas , señala que existe una estrecha conexión entre intensidad de crecimiento

micelial con inicio de lisis, formación de toxinas y viabilidad del hongo. Añade, que con la desintegración del micelio tiene lugar la formación de sustancias tóxicas para la planta. Por otra parte, indica que la lisis y pérdida de viabilidad eran máximas a partir de los 23°C. En medios nutrientes pobres el micelio se desintegraba completamente. El desarrollo del hongo a baja temperatura (7°C) se caracterizaba por un gran crecimiento y longevidad del micelio, como resultado de ello no se producían toxinas en invierno y los síntomas de la enfermedad eran menos patentes. Con el aumento de la temperatura el efecto tóxico sobre las plantas llegaba a manifestarse, pero a muy altas temperaturas (por encima de 30°C.) el desarrollo de la enfermedad era inhibido. Se aconseja tratamiento de calor para el control del "mal secco" en limoneros, crecidos en invernadero.

GRANITI (1969) señala que en Fitopatología sería importante llegar a conocer los mecanismos químicos a través de los cuales los patógenos infectan e invaden los tejidos del huésped, así como el modo en que las plantas reaccionan a la invasión de los parásitos, lo que es de capital importancia en el estudio de la naturaleza y control de las enfermedades de las plantas. En muchas enfermedades infecciosas de éstas, se ha observado que las actividades químicas de los patógenos son esenciales en la patogénesis. Cuando son conocidos todos los mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en la virulencia y resistencia, los parásitos pueden ser mejor contro-

lados y las condiciones de resistencia en las plantas pueden ser aumentadas o inducidas.

Según EVOLA et al. (1.973), en estos últimos años se ha indagado mucho acerca de los enzimas pectinolíticos y celulosólicos de hongos y bacterias fitopatógenos en relación al posible papel que estos enzimas desarrollan en los procesos de patogénesis. Es sabido en efecto, que numerosos patógenos son capaces de degradar por vía enzimática las laminillas medias y las paredes celulares de los tejidos vegetales, y que tal capacidad, está frecuentemente relacionada a su patogenicidad.

Mucho síntomas mostrados por plantas afectadas por enfermedades de secas, son consecuencia de la continua secreción, por parásitos vasculares, de enzimas degradadores de la pared celular de los elementos del xilema. Hasta un cierto punto, según GRANITI (1.969) las actividades enzimáticas de D. tracheiphila contribuyen probablemente a la disfunción vascular y a la expresión de síntomas del "mal secco". Enzimas pectolíticos, celulosólicos y tal vez otros enzimas degradadores excretados por el hongo, cuando invaden el sistema vascular, por acción sobre las paredes celulares del xilema parenquimático celular, pueden liberar macromoléculas o pequeños polímeros, que a su vez, junto con otros materiales del huésped o de origen fúngico forman fácilmente geles o gomas. Parece, sin embargo, que las oclusiones gomosas de los elementos vasculares no --

impiden el avance del hongo que los invade y que probablemente utiliza los productos secundarios de su degradación, ya que el hongo crece rápidamente sobre las gomas de plantas. Como usualmente las tilosis no se forman en los cítricos, el parásito puede extenderse fácilmente dentro de los elementos traqueales, aunque estén obturados por gomas, y alcanzar también órganos distales de las plantas mediante formas conidiales libres, GOIDANICH et al. (1.948) y BUGLIANI et al. (1.959). (Fot. 5).

GOIDANICH y RUGGIERI (1.948 y 1.953) suponen que la decoloración de la madera rosa-salmón podría deberse a la acumulación de estas sustancias gomosas en el xilema infectado, donde ellas pueden tomar pigmentos originados por el huésped. Sin embargo, algunos derivados de los pigmentos fúngicos podrían ser fácilmente absorbidos por las gomas, contribuyendo así a los peculiares síntomas internos de la enfermedad.

Aunque la capacidad del hongo para excretar fitotoxinas es bastante limitada en medios artificiales, el jugo obtenido a partir de madera de cítricos infectados, contiene materiales fitotóxicos que no están presentes en la madera sana. Estas sustancias tóxicas parecen ser fácilmente trasladadas desde los tejidos invadidos por el hongo a los órganos distales, sobre los que se producen los síntomas. Por esto se podría deducir que las vivotoxinas se forman en los tejidos infectados como un resultado de la interacción huésped-parásito.

CHAPOT (1.972), describe síntomas de infección por el hongo.

Cuando la infección tiene lugar por vía hipógea se producen dos formas de "mal secco", denominadas "mal nero" y "mal fulminante".

Según CUTULI (1.972) en el "mal nero" la enfermedad se evidencia al principio por una clorosis de la nerviación foliar limitada a alguna ramita; sucesivamente, la clorosis foliar puede afectar una rama pequeña o grande, o incluso todos los frondes del árbol. En el estadio siguiente se da una progresiva defoliación de la rama afectada, con caída de los frutos aún al estado de premaduración, así como la aparición de leña seca.

Prosigue este mismo autor, indicando, que cuando se podan las ramas apicales después de la aparición de los primeros síntomas, no se observa oscurecimiento interno del leño, ni la característica coloración amarillo-zanahoria de los círculos leñosos externos. Por el contrario, si estos cortes se realizan sobre ramas de 3 cm. de diámetro en adelante, se aprecia un ligero oscurecimiento del cilindro leñoso, aumentando la coloración de intensidad conforme las secciones se efectúan mas hacia la base de las ramas, mayormente la bifurcación de las ramas o en las coronas radicales, donde el oscurecimiento presenta frecuentemente márgenes irregulares y asume una coloración muy intensa color negro-sepia,

que hacia la parte externa vira a marrón claro. Los tejidos así de intensamente coloreados se caracterizan también por el olor que emanan de melón ultramaduro, RUGGIERI (1.948). En las secciones de corte de las ramas, incluso después de un cierto tiempo del corte, se observa la formación de sustancias gomosas amarillentas limitada a uno o mas círculos del leño. La característica coloración amarillo-zanahoria que se evidencia descortezando las ramas afectadas de la forma normal del "mal secco", en los casos de "mal nero" se nota a partir del tronco y a lo largo de la rama, pero solamente cuando el oscurecimiento interno del leño ha alcanzado la máxima expansión.

Asimismo CUTULI (1.972) observó que en correspondencia con la raíz infectada el tronco muestra la necrosis completa de una estría de corteza bien delimitada marginalmente, que permanece adherida al tejido leñoso inferior completamente oscurecido, lo que se obtiene por una mayor expansión del parásito hacia un círculo leñoso. En estos casos, es frecuente notar el rápido colapso de la rama correspondiente, y una sintomatología externa de tipo "mal fulminante", por la mas rápida difusión que el parásito asume una vez que alcanza en la corona radical los círculos leñosos mas externos. En este caso indica CUTULI (1.972), que no se evidencian los síntomas de tipo "mal nero", resultado el oscurecimiento localizado en los círculos leñosos mas externos, ni se evidencian



los característicos síntomas externos del "mal secco", como clorosis, defoliación gradual de las ramitas y consecuente desecamiento de los frondes con las hojas que permanecen unidas a las ramas.

#### 1.4. Procesos de infección

Según la parte del árbol por la que se inicia la infección, varía el sentido de propagación y velocidad de la enfermedad en su interior. Si se realiza por el extremo de una rama gruesa o de una ramificación, el sentido es centrípeto y mas lento que -- cuando la infección tiene lugar por las raíces o por la base del tronco.

1.4.1. Infección por vía hipogea. - SCRIVANI, (1.954), infectó plantones y observó que los síntomas no aparecían hasta que el patógeno no alcanzaba la cima del árbol. FEDORINTCHIK (1.953 a), indicó que la marchitez de una rama se efectúa un mes o dos después de iniciados los síntomas, añadiendo, que en limoneros el micelio se expande en los vasos y después hacia el corazón, ocurriendo inversamente en los otros cítricos.

RUGGIERI (1.931 b) atribuye el hecho de las infecciones hipogreas a las hojas del suelo infectadas. STEPANOV y CHALICHKINA (1.954) subrayan que en condiciones naturales se da este tipo de infección en muy pocos casos, por exigir una temperatura y hu-

medad adecuada, y que el patógeno esté en contacto con heridas del cuello del árbol.

SAVASTANO y FAWCETT (1.931) señalan que los casos mas graves y rápidos provienen de la infección radical. Actualmente son bien conocidas las dos formas de "mal secco" debidas a infecciones hipógeas del árbol : "mal nero" y "mal fulminante"

El "mal nero" según, CARRANTE (1.938), RUGGIERI (1.940 c, y 1.948) y CARRANTE y RUGGIERI (1.947), es debido a infecciones primarias que se determinan a la altura del aparato radical.

CUTULI (1.972) señala que en el "mal nero" la enfermedad se caracteriza por un desarrollo inicial muy lento, si se considera el intervalo de tiempo transcurrido desde el momento de la infección a la muerte de la planta, mientras que asume un progreso muy veloz si se tiene en cuenta solamente el tiempo transcurrido entre la aparición de los primeros síntomas externos a la destrucción completa de la planta o de parte de la misma.

Este mismo autor observó que al descalzar alguna planta, siguiendo el oscurecimiento desde la parte alta hacia abajo mediante secciones sobre el tronco y sobre el inicio de las raices , la coloración del leño se presentaba frecuentemente sobre una sola rama radical, la que estaba mas cerca de la superficie. Prosiguiendo el curso de la raiz hasta su extremidad vió que generalmente

era una raíz de ínfimo orden la que mostraba el oscurecimiento del tejido leñoso que hacia el exterior iba virando a marrón claro; tal raíz, presumiblemente el punto de partida del proceso infectivo casi siempre alcanzaba el nivel del terreno. O bien, el punto de partida del oscurecimiento a la altura de una raíz, coincidía siempre con una vieja lesión causada posiblemente por una técnica de cultivo; por otra parte, la coloración del leño se extiende desde la lesión en dirección al tronco, mientras que va siendo cada vez menos intensa o no se percibe un sentido opuesto, hacia la extremidad de la raíz. SAVASTANO Y FAWCETT (1.931), observaron un recorrido similar en experiencias de inoculación artificial en las raíces.

El "mal fulminante" tiene lugar cuando las infecciones primarias se determinan en la base del tronco o afectan particularmente los círculos leñosos externos de una raíz en un periodo del año favorable a la progresión del patógeno en los vasos del huésped, llegando a morir la planta entera o una rama en un corto plazo de tiempo.

En relación a la reproducción experimental del "mal secco" SALERNO Y CATARA (1.967 b) indican como método de inoculación mas simple y rápido, la incisión trasversal del tallo, obteniendo buenos resultados con cultivos líquidos mantenidos en agitación, incluso procedentes de razas que habían perdido capacidad de

producir picnidios.

1.4.2.- Infecciones por vía epigea - La infección por las ramas se realiza a través de las discontinuidades de la corteza ocasionadas por vientos o heladas.

Mayor importancia se da a la infección por las hojas PETRI (1.930 d) señala que en su parte cóncava pueden albergar esporas o picnidios que al germinar pueden penetrar por los estomas. RUGGIERI (1.931 b) cita, que primero son invadidas las nerviaciones de las hojas, y posteriormente el leño, y que se forman fructificaciones sobre las cicatrices originadas por la caída de las hojas y sobre la epidermis de las ramas.

Se ha pensado que la sensibilidad varietal podría estar en conexión con la mayor o menor densidad de los estomas sobre la nerviación central de las hojas. RABINOVITZ-SERENI (1.931 c) después de la determinación del número de estomas en el limonero, mandarino y naranjo amargo, no consiguió evidenciar esta correlación entre el número de estomas y sensibilidad de la especie considerada.

1.4.3.- Infección por los frutos. - No se realiza a continuación de las ramas primarias y secundarias como cabría pensar. RUGGIERI (1.940 b y c), observó que la infección existente en la base de limones producidos por "verdelli" proseguía hacia las ramas terminales (el "verdelli" consiste en suspender el riego hasta finales de junio, para la obtención de limones de primavera y sobre todo de verano, no volviendo a continuar los riegos hasta finales de julio o de agosto, acompañándolo de un importante aporte de abono químico. De esta forma se obtiene una floración temprana, produciendo igualmente frutos precoces de 4 a 6 meses sobre la estación normal, así pues consumibles al final de la primavera y en el verano). CAHPOT (1.963) señala que las heridas que dejan estos limones al ser recolectados en el inicio de la primavera, constituyen una vía de contaminación durante las estaciones favorables.

### 1.5. Fuentes y velocidad de contaminación

1.5.1. Fuentes de contaminación. - Puede ser cualquier sector del árbol que contenga fructificaciones, incluso perteneciente a zonas ya muertas y podadas, STEPANOV (1950b). De igual forma pueden ser portadores frutos de apariencia sana provenientes de árboles infectados, cuya comercialización puede constituir un medio de propagación, si bien pueden ser identificados, por presentar un aspecto mas tierno y una coloración naranja o roja en la cicatriz del tallo, KLOTZ (1950-53), ANON (1.969) en contextos relativos a la legislación del Líbano, cita la existencia de un control de los cítricos importados para detectar la posible presencia en ellos del Deuterophoma tracheiphila.

Otra vía de diseminación radica en la formación de conidos mono o bicelulares de forma irregular y diversas dimensiones, que se pueden dar en cultivos o en los vasos de la madera muy joven, que la corriente de savia transporta, GOIDANICH et al. (1.948).

KOYEAS y ANASTASSIADIS (1.962) atribuyen un caso de diseminación al común Pica-pica L., ya que encuentran en una plantación de limoneros un árbol fuertemente infectado de "mal secco" con nidos del mismo en sus ramas.

1.5.2. Velocidad de infección. - FAWCETT (1.936) expone que el avance del patógeno en el árbol es muchísimo

mayor en sentido de la base hacia la cima, que inversamente. Prosiguen este estudio GOIDANICH y RUGGIERI (1.947 a) que observaron que esta velocidad de avance sólo se podía justificar por el contacto directo entre el patógeno y los tejidos del huésped.

#### 1.6. - Acción del hongo y reacción del huésped

1.6.1. Acción del hongo.- PIRTSLHALAISH VILI et al. (1.969) realizaron estudios bioquímicos del patógeno, -- identificando por cromatografía de las paredes celulares del hongo -- los siguientes aminoácidos: isoleucina, leucina, valina, prolina, alanina, y otros.

GIKASHVILI (1.968) efectuó estudios sobre el mecanismo de acción del P. tracheiphila.

Según BUGGIANI et al. (1.959) al invadir los vasos el micelio, se produce una formación gomosa que reduce enormemente la corriente. Simultáneamente, en los tejidos leñosos se observa una coloración que varía de rosa salmón a rojo zanahoria, así como una coloración castaña que según SAVASTANO y FAWCETT (1.931) podía constituir un estado más avanzado de precedente manifestación.

1.6.1.1. Pigmentos producidos por el  
P. tracheiphila. Es sabido que las colonias del hongo en cultivo pier

den con el tiempo algunas de las características que muestran después de su aislamiento de plantas enfermas, como la pigmentación roja.

Asimismo se conoce, que la producción de pigmentos rojos aparece como un carácter segregante del hongo en sus diferentes variantes o razas. La naturaleza del medio de cultivo y las condiciones ambientales afectan notablemente la producción de pigmentos, PETRI (1.930 y 1.930 a), ORSHANSKAYA (1.952), y GOIDANICH y RUGGIERI (1953).

En cultivo se producen pigmentos del hongo dentro de las células hifales, que son excretados en su superficie externa como agregados cristalinos rojizo-castaño. Las hifas más viejas están con frecuencia incrustadas con sustancias rojizo-anaranjadas que no se disuelven en medio acuoso.

El hongo produce dos pigmentos antraquinónicos en -- gran cantidad (hasta el 16% de peso seco de micelio): helminthosporin y cynodontin; éste último es una forma oxidada del precedente, QUILICO et al. (1.952). El helminthosporin cristaliza en agujas marrones y el cynodontin como láminas bronceadas. Igualmente el hongo produce un tercer pigmento amarillo del que no se conoce su naturaleza química.

La coloración típica que muestra la madera infectada en relación a las características cromógenas de las razas del hongo, ha sido un tema muy debatido en el pasado. Inicialmente se sugirió que la condición de decoloración de la madera podía estar relacionada



con los pigmentos, los que no son reconocibles como agregados cristalinos sobre las hifas dentro de los elementos traqueales. PETRI (1.926, 1.926 a, 1.927, 1.929, 1.930, 1.930 a, y 1.930 b) postuló - que estos pigmentos estaban difundidos dentro de las paredes celulares y que también son absorbidos por las gomas y resinas tan abundantemente formadas en el xilema infectado. De esta forma, las paredes celulares podrían virar a rosáceo, mientras que las gomas y resinas podrían asumir un color amarillo y amarillo y rojizo-castaño, respectivamente. Sobre esta base, autores rusos KANTSHAVELI y GIKACHVILI (1.948), ORSHANSKAYA (1.952 y 1.953) FEDORINCHICK (1.953) y SINITSYNA (1.953) e italianos, BÀZZI y SCRIVANI (1.954) siguiendo tratamiento químicos, propusieron evaluar la extensión de la expansión del hongo en tallos y porta-injertos según el cambio de color de la madera infectada.

En la diagnosis precoz del "mal secco", los reactivos de ORSHANSKAYA (1.953) y BAZZI y SCRIVANI (1.954) causan el viraje del típico color rosa-salmón de la madera infectada todavía no visible a un intenso amarillo-naranja, originando muchas veces este mismo efecto, al ser aplicados sobre las gomas de las heridas de la madera de cítricos mecánicamente lesionados, BUGGIANI et al. (1.959). No obstante, el helminthosporin y cynodontin viran a violeta o azul con hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido de potasio (KOH), QUILICO et al. (1.952). Por esto, la reacción de la madera

de virar de rosa-salmón a amarillo-naranja no debería ser atribuida a estos pigmentos.

GRANITI (1.969) extrajo el típico color rosa-salmón de la madera infectada de cítricos con varios solventes orgánicos (petróleo, éter etílico, etanol y metanol). Estos extractos, al ser observados espectrofotométricamente y cromatográficamente, mostraron picos y manchas de absorción que diferían de los obtenidos -- con comparables extractos de micelio obtenidos en cultivo. Esto podría indicar que la mayoría de los componentes de los extractos de la madera no correspondían a los pigmentos rojos y amarillos producidos en cultivo por el hongo; no obstante estos pigmentos originados por el P. tracheiphila podrían ser absorbidos por las gomas, dando productos como glucósidos, lacas u otros subproductos de distinta coloración.

1.6.1.2. Actividades enzimáticas del hongo. - En relación a esto, se sabe que la mayoría de los elementos vasculares de la madera de cítricos afectados por la enfermedad están obturados por una profusa formación de goma. BUGIANI et al. (1.959) fueron capaces de inducir la formación de gomas en vasos artificialmente, introduciendo sustancias pectolíticas dentro del xilema de brotes de naranjo amargo, que eran muy parecidas a las producidas por infecciones del P. tracheiphila, e incluso por lesiones mecánicas. Sin embargo, no existe evidencia experimental sobre si el hongo po-

dría o no realmente producir enzimas capaces de degradar los componentes de las laminillas y paredes celulares del huésped.

GRANITI (1.969) a partir de filtrados de cultivos, examinó la presencia de enzimas pectolíticos a varios pH (pH 3,5-9), mediante métodos de viscosimetría y espectrofotometría, observando -- que el hongo segrega los siguientes enzimas pectolíticos: poligalacturonasa (PG), polimetilpoligalacturonasa (PMG), y pectin liasa (poligalacturonato trans-eliminasa o PGTE).

Asímismo, dicho autor probó estos filtrados para evidenciar su capacidad de maceración sobre cortes de tejidos de tubérculos de patatas, ocurriendo la maceración en todos los pH ensayados (pH 3-8), siendo mas rápida entre pH 3 y 7,5.

De igual forma, GRANITI (1.969) realizó otras indagaciones para averiguar las actividades celulolíticas del hongo, lo que -- consiguió haciendo crecer colonias sobre una solución de Czapek con teniendo un derivado de celulosa: carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono. La presencia de celulasas en estos filtrados de cultivo la ensayó por métodos de viscosimetría, detectándose la máxima actividad a pH 5,5.

Una demostración de la fuerte actividad enzimática del hongo la obtuvo mediante ensayos de infección artificial, inoculando heridas hechas en tallos y cubriendo luego dichas heridas con bandas de látex a las que el hongo transformó en una masa rojiza, en las que

se diferenciaban picnidios; por tanto el hongo es capaz de degradar en cultivo látex comercial.

EVOLA et al., (1.973) indagaron la producción "in vi-  
tro" de enzimas pectinolíticos, celulosolíticos y  $\beta$ -glucosidásicos de P. tracheiphila, en cultivos de diversa edad, incubados a distin-  
ta temperatura, observando, que el hongo producía: pectin-metil-es-  
terasas (PME) poligalacturonasas (PG), trans-eliminadas del poliga-  
lacturonato (PGTE), enzimas macerantes (MA), enzimas celulosolí-  
ticos (Cx) y  $\beta$ -glucosidasas. Los cultivos incubados a 12° C. pre-  
sentaban mayor actividad de PME, PG, PGTE, y MA. En los cul-  
tivos incubados a 19° C., resultaron más activos los enzimas  $\beta$ -glu-  
cosidásicos, y en los cultivos incubados a 16° C. resultaron más acti-  
vos los Cx.

1.6.1.3. Actividades tóxicas del pató-  
geno. - Debido a que éste no puede ser aislado de las nerviaciones -  
cloróticas de las hojas distantes del punto de infección de cítricos ino-  
culados en el leño, se ha pensado, que una acción sistémica tóxica es-  
tá posiblemente implicada en la enfermedad.

Desde el inicio del estudio del "mal secco", fué suge-  
rido que los metabolitos tóxicos excretados por el hongo estaban im-  
plicados en la patogénesis y sintomatología de la enfermedad, PETRI  
(1.930). Sin embargo, estudios de POLJAKOV y SHUMAKOVA ---

(1.951) así como de ORSHANSKAYA (1.952), indicaron por primera vez que filtrados de cultivos del hongo presentaban fitotoxinas, observando que mostraban una toxicidad específica frente a trozos de Citrus, Cyperus y otras plantas. Asimismo, en otras experiencias, extractos miceliares o cultivos, probaron ser tóxicos a Cissus antarctica Vent. Las condiciones más favorables para la formación de toxinas fueron investigadas por POLJAKOV y SCHUMAKOVA (1954); SCHUMAKOVA (1964) vió que los compuestos tóxicos del patógeno procedían de la lisis del micelio, y que tanto la lisis como la liberación de toxinas incrementaban a 23°C. y a temperaturas superiores. A las mismas temperaturas, la intoxicación de la planta llegaba también a manifestarse en la naturaleza.

Como aplicación de las investigaciones realizadas en la U.R.R.S., las toxinas del P. trachiephila fueron ensayadas para seleccionar semillas de cítricos resistentes al "mal secco", ORSHANSKAYA y ORDZHONIKIDZE (1.956) y ORSHANSKAYA (1.960), los cuales observaron que filtrados de cultivos del hongo mostraban toxicidad selectiva frente a semillas susceptibles de limonero "Villa franca", las cuales habían sido empapadas en dichos filtrados antes de ser sembradas en la solución nutritiva. GOLIADZE (1.957) usó trozos de limonero en un método similar. Ambas técnicas se consideraron de importancia práctica en la búsqueda de cítricos resistentes.

SCRIVANI (1.954) utilizó . filtrados de cultivos crecidos en medio de Czapek enriquecido con el 9% de licor de avena - macerada, con idea de incrementar la producción de toxinas, observando que dichos filtrados eran tóxicos a raspaduras de limonero y tomatera. GRANITI (1.958) en experiencias similares, observó lesiones de distinta naturaleza sobre hojas y tallos de las tomateras ensayadas.

En cuanto a indagaciones realizadas "in vivo" para demostrar la presencia de vivotoxinas en líquidos traqueales o en extractos de madera infectada por el hongo, KIYASHO (1.951) indicaba que los e. tractos de madera infectada de "mal secco" fueron tóxicos a trozos finos de Citrus e indujeron epinastia y caída de las hojas en brotes jóvenes sanos y en limoneros susceptibles, no ocurriendo esto en limoneros y mandarinos resistentes. AKHVLEIANI (1.958) intentó aislar vivotoxinas de cítricos infectados a partir de un extracto acuoso de madera, separando una sustancia cristalina rojo-anaranjada que disolvió fácilmente en alcohol y ácido acético, no extrayéndola de madera sana. Esta sustancia se vió era tóxica a virutas de plantas de limonero y tomatera ensayadas.

SCRIVANI (1.954) y AKHVLEDIANI (1.958) aislaron del leño de limoneros infectados sustancias tóxicas y no de leño sano. POLIAKOV y SCHUMAKOVA (1.954) determinaron los valores óptimos de temperatura y pH de medios de cultivo para el desarrollo de estas

toxinas, observando que era de 29 ó 30° C. para un pH 4 a 7,8, durante los primeros días.

METLISKII (1.966) aisló la toxina "A", evidenciando que se mostraba en polvo amorfa, carecía de N, P, S y halógenos, se descomponía a 92° C., siendo soluble en disolventes polares. En el espectro de absorción de L.U.V. mostraba un pico a 280 mμ, liberaba CO<sub>3</sub>HNa y se decoloraba por MnO<sub>4</sub>K y agua de Br. Señala asimismo, que la causa directa de la marchitez, se debe a la entrada de productos formadores de gel por la células de la planta en los vasos del xilema, bajo la influencia de la toxina.

GOLIADZE (1.970) preparó toxina del hongo a partir de filtrados de cultivos de un mes y medio a dos meses. Plántulas de limonero al estado de tres hojas se ensayaron sumergiéndolas durante dos a cuatro días en toxina no diluida, o diluida al 50 y 25%. Las plántulas utilizadas como control, fueron tratadas con caldo o agua destilada solamente. Las tasas de supervivencia fueron las siguientes: 100% de toxina, 2,5%; 50% de toxina, 37,5%; 25% de toxina, 65%; caldo, 74,3%; y agua destilada 94%, 4%. Todas las plántulas que sobrevivieron a la inmersión del 100% de toxina, fueron resistentes a la aplicación del 100% de toxina y esporas del hongo, mientras que los que sobrevivieron al 50% y 25% de toxina fueron solamente parcialmente resistentes (32,1 - 56%).

GOLIADZE et al. (1.972) trataron semillas y plántulas híbridas de un número de variedades de limonero con la toxina del -- hongo. Un 57,1% de las plantas tratadas presentaron albinismo por efecto de la toxina sobre el control genético de la síntesis clorofílica.

NACHMIAS et al. (1.977a) estudiaron la purificación y algunas propiedades biológicas de un glicopéptido producido por el *P. tracheiphila*, observando que sus cultivos producen un glucopéptido fitotóxico extra-celular, capaz de incitar síntomas similares a los del "mal secco" en brotes de limonero. El Pm estimado de la toxina fué de 93.000, siendo su punto isoeléctrico de 4,3. La porción de hidratos de carbono (29,5 %) estaba compuesta por manosa, galactosa y glucosa. La porción peptídica (36%) contenía la mayoría de los aminoácidos comunes, como aspartato, glutamato, threonina y serina. Mediante estudios de Beta-eliminación del péptido se observó que la threonina y serina estaban unidas por enlaces gluco-peptídicos. Asimismo la reacción positiva de sustancias aniónicas de la toxina hidrolizada con el reactivo carbazol, sugiere la presencia de ácidos glucosados en la estructura de la toxina. La toxina es termo-estable y no es específica del huésped.

La inyección de la toxina pura dentro de hojas de limonero causó necrosis y clarificación de nerviaciones, seguido del desecamiento y caída de las hojas. Su actividad biológica fué abolida por enzimas proteolíticos, tales como pronasa, papaina o pancreatina.



La producción de la toxina incrementó durante la fase estacionaria de crecimiento.

NACHMIAS et al. (1977b) estudiaron cuantitativamente la toxina de "mal secco" mediante bioensayos basándose en la pérdida de electrolitos de discos de zanahorias tratados. Se estableció una relación lineal entre concentración de toxina, pérdida de electrolitos y medida de la solución del baño por conductividad. La menor cantidad de toxina que podía ser detectada por este método fué de 32 µg/ml. La toxina disminuyó la transpiración de raspaduras de tomate. Obtuvieron una curva hiperbólica cuando la reducción de las transpiración fué considerada en función del tiempo. Consiguieron obtener toxina marcada al hacer crecer el hongo en presencia de aminoácidos radiactivos. La toxina, purificada radiactiva tenía una actividad específica de  $5,5 \times 10^{14}$  cpm/mg de toxina. La radiactividad fué rápidamente transportada a raspaduras de limón. La detección de radiactividad en las hojas estaba correlacionada con la aparición de síntomas. El crecimiento de callus de una variedad de limonero (Eureka) altamente susceptible al "mal secco" se inhibió con 0,3 mg. de toxina/ml, mientras que la variedad de naranjo (Shamouti) no fué afectada por la toxina.

#### 1.6.2. Reacción del huésped. - PETRI (1.930 c)

observó que el desarrollo del micelio era más rápido en savia de limo

nero que de naranjo y creyó que se debía a la existencia de ciertas sustancias enzimáticas o de otra naturaleza. GOIDANICH y RUGGIERI (1.947 a) niegan tal sugerencia, señalando que la germinación de conidios y picnidios tras el desarrollo miceliar son igualmente estimuladas por el jugo extraído de corteza y leño de naranjo, así como de naranjo amargo, a pesar de ser considerado el segundo sensible y el primero resistente. Por otra parte GOIDANICH y RUGGIERI (1947 c) sugieren que a continuación de infecciones por heridas, se originan modificaciones anatómicas de carácter defensivo.

BEN AZIZ et al. (1.962) citan dos sustancias inhibidoras del crecimiento del micelio:  $C_1$  y  $CS_2$ , presentes en las variedades de mandarino resistente y no en limoneros y otras especies -- sensibles como el Ruogh lemon y la lima, considerando que  $CS_2$  puede ser naringerin y  $C_1$  un inhibidor más fuerte no identificado.

DEMETRAZDE et al. (1.970) compararon la circulación del agua en limoneros sanos y enfermos, observando, que las hojas de éstos hasta su caída presentaban igual cantidad de agua libre que los sanos, siendo significativamente menor la combinada; la intensidad de transpiración y capacidad de retención de agua en plantas infectadas, era primero reducida para aumentar luego, y que en ambos casos la concentración de linfa celular permanecía constante. Añaden por último, que en los enfermos la descomposición de sustancias orgánicas excedía a su síntesis.

DEMETRADZE y DZANELIDZE (1.970) observaron en hojas de limonero afectados, reducciones significativas de la fotosíntesis y transpiración, humedad, almidón, nitrógeno protéico y total, pero la concentración de azúcar y respiración fueron incrementadas al inicio de la enfermedad. Las actividades de la catalasa y peroxidasa mostraron menores variaciones con tendencias no claras.

DZAHANELIDZE y TSANAYA (1.972) observaron que el contenido en aminoácidos libres en las hojas de los cvs, Gruzinskii y Villa Franca sanos pero susceptibles al "mal secco", fué mayor que en el cv Meyer. En las plantas del cv Gruzinskii el contenido total de aminoácidos libres se redujo a la mitad, pero los contenidos en histidina y leucina se alzaron, mientras que en el cv Villa Franca, los contenidos en la hoja en aminoácidos dicarboxílicos y sus amidas ascendieron, pero el de arginina se redujo. Los datos en relación a los cambios en el contenido en la hoja de 17 aminoácidos durante mayo y junio, fueron tabulados.

DAVINO et al. (1.974) en pruebas sobre los cambios del contenido de fenol libre, observaron que en plántulas de naranjo amargo, inoculados por incisión transversal del tronco, mostraron un incremento de fenoles en los extractos de éste. En las plantas inoculadas por inmersión de las hojas en una suspensión conidial, los extractos de éstas manifestaron tras 6 días un contenido fenólico que excedió en 2,6 veces al del control. En los injertos de limonero sobre naranjo

amargo con un interinjerto de naranjo dulce la inoculación con el hongo en agua estéril indujo a un alza en el contenido fenólico de corta duración, no encontrándose diferencias significativas hasta pasados 20 días.

KALICHAHA y DZNELADZE (1.973) efectuaron pruebas sobre las características espectrales de intensidad de fluorescencia en hojas sanas y enfermas de limonero.

#### 1.6.3. Interrelación hongo-virus. - GRASSO

et al. (1.970) observaron que filtrados de cultivos del hongo tuvieron un efecto inhibitorio sobre el virus de la variegación de los agrios, añadiendo que esta acción parece ser ejercida sobre el huésped, y no sobre el virus, traduciéndose un cambio de la fisiología de las células inicialmente infectadas para prevenir la posterior replicación del virus.

SALERNO et al. (1.970) estudiaron la influencia de algunas virosis sobre el desarrollo de la enfermedad y del contenido fenólico en plantones de naranjo amargo con exocortis, psorosis gomosa cóncava o con el virus de la variegación infecciosa de los cítricos, observando que los plantones variaron en susceptibilidad al "mal secco" en relación al virus y edad de la infección, siendo los plantones con variegación menos susceptibles que los no infectados. Asimismo, observaron, que el contenido en fenoles libres y combinados variaron en plantones sanos, infectados por virus, e infectados por virus y el

P. thracheiphila, no encontrando relación entre contenido fenólico e intensidad de infección.

Estudios de cítricos en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Pisa (Italia) (1.971), incluyen informes -- acerca de la distribución y naturaleza de inhibidores endógenos virales y el desarrollo del "mal secco", así como de la conducta del hongo en plantones de naranjo amargo con variegación infectiva.

SALERNO et al. (1.971) realizaron ensayos sobre las modificaciones del metabolismo fenólico relativas al "mal secco" en plantones de naranjo amargo infectados de virus antes de inocular el hongo, observando que en los plantones disminuía la susceptibilidad al hongo, pareciendo estar éste hecho relacionado con la acumulación de algunos fenoles (esencialmente el á. m-hidroxi benzoico, á. ortocumárico y á. ferúlico), como respuesta a la infección de "mal secco", ya que el incremento que mostraron ciertos fenoles en los plantones no infectados por el virus fué bastante menor que en los infectados.

CATARA et al. (1.971) en pruebas sobre el desarrollo de la enfermedad y comportamiento del hongo en estratos agarizados, en relación a la variación del contenido fenólico en plantones de naranjo amargo afectados de variegación, observaron, que el desarrollo de la enfermedad era más lento en los plantones infectados con el virus que en los no infectados. Asimismo añaden, que el crecimiento de las colonias en diferentes cultivos con extractos de plantones infecta

dos por virus era menor, variando su morfología según el extracto utilizado. Esta reducción de crecimiento en laboratorio y lentitud del desarrollo de la enfermedad en los plantones infectados por el virus la creen debida a los compuestos fenólicos.

KANCHAVELI y KALICHAVA (1.971) estudiaron la actividad fotosintética de hojas de plantones de limonero sanas e infectadas por el virus del "mosaico del tabaco", y de hojas de plantones sanos e infectados por el P. thracheiphila, utilizando técnicas de resonancia electroparamagnética, observando, una reducción en la actividad en las hojas enfermas debida a la destrucción del enzima portador del Mn, extremadamente inestable, que constituye un sistema directamente responsable de la liberación de oxígeno durante la fotosíntesis.

### 1.7.- Ecología

1.7.1. Condiciones generales. - Las infecciones primarias del "mal secco" se dan periódicamente, correspondiendo con el estado de reposo vegetativo de los agrios en otoño e invierno. RUGGIERI (1.953 a, b, y 1.956) manifiesta que se efectúan de noviembre a febrero, si bien particularmente en enero en que las plantas están en reposo vegetativo sin relación con las condiciones ambientales. STEPANOV y SCHUMAKOVA (1.952) confirmaron estos datos en

regiones rusas de tipo subtropical.

PETRI (1.930 b y c) evidencia que el crecimiento del micelio en medios sólidos y líquidos se realiza entre 10 y 28°C., cesando por debajo de 6°C. y por encima de 30°C. Asimismo, indica que a temperatura algo superior a 30°C. el micelio se destruye en 10 días. Añade, que la formación del pigmento rojo en la línea cromógena se retarda a temperaturas superiores a 24°C. y que la formación de picnidios se inicia entre 12 y 24°C.

RABINOVITZ-SERENI (1.931 a) remarca la influencia positiva del gas carbónico sobre la germinación de esporas, porcentaje de germinación y longitud media y máxima de los tubos germinativos. En otra publicación RABINOVITZ-SERENI (1.931 b) cita que la temperatura influye en el sentido de que su aumento y la disminución de la humedad tienen una acción muy significativa sobre la hinchazón de las esporas y la emisión de tubos germinativos. A 18-20°C. todas las esporas se inflan, produciendo el 80% de las mismas tubos largos de 300 a 350 µm; por el contrario, hacia 30°C. sólo se hinchan el 10% y las pocas esporas que germinan no producen más que tubos de longitud inferior a 100µm.

RUGGIERI (1.948) indica como factores principales que afectan el curso de la enfermedad la temperatura y humedad y a veces las heladas, señalando como factores auxiliares: el viento que disemina las esporas del patógeno y origina heridas a la planta, la composi-

ción química de ciertos suelos arcillosos, la variedad y edad de los árboles, la estación en que los plantones son plantados y la elección de árboles para plantar, el portainjerto, su influencia sobre la predisposición o resistencia del esqueje, fertilizantes, arado profundo, y asociaciones con plantas herbáceas, señalando perjudicial el "verdelli".

STEPANOV (1950 b) notifica que los picnidios aparecían a partir de 5°C. - incluso a temperatura inferior - hasta 30°C., cesando por encima. La temperatura óptima de velocidad de aparición es de 21°C. y en cuanto a la cantidad de producción, 12°C.

CHAPOT (1.963) señala que las infecciones pueden realizarse fácilmente en invierno, en el rigor del otoño y en primavera, según la temperatura de estas estaciones, con formación de picnidios a baja temperatura, así como de un desarrollo miceliar, cesando al llegar el calor. La coloración rosa a rojo que la raza cromógena origina en las fibras del leño, es particularmente intensa durante los periodos de temperatura poco elevada, y añade, que la humedad es un factor indispensable en la liberación de esporas, ya que por su efecto estallan los picnidios.

SALERNO (1964 b) mediante ensayos sobre la influencia de la temperatura en el crecimiento del hongo, producción de picnidios y germinación de picnoconidios, observó, que el crecimiento y producción de picnidios tenía lugar de 5 a 25°C., siendo la tempera-



tura óptima para el crecimiento y rapidez de producción de picnidios de 20 a 25°C. Para tamaño y porcentaje de germinación de picnidios, la temperatura óptima era de 10°C., siendo para el número la temperatura óptima de 15°C. Asimismo, cita, que la germinación de picnidioesporas tenía lugar de 5 a 30°C., siendo la temperatura óptima de 25°C.

DANELIJA (1.968) observó que el hongo sobrevivía durante un largo periodo sobre material de la planta y sobre suelo estéril, pero sobre suelo no estéril era inactivado por microorganismos. De lo que pudo concluir que después de eliminar los cítricos enfermos, el material sano puede ser plantado de nuevo sin demora.

EVOLA et al. (1.973) estudiaron la actividad enzimática pectinolítica, celulolítica y  $\beta$ -glucosidásica del hongo, utilizando cultivos del hongo de distintas edades e incubados a diversas temperaturas, observando como conclusión, que la pectin-metilesterasa, poligalacturonasa, poligalacturonato transeliminasa y enzimas de maceración fueron más activos a 12°C. y los enzimas celulolíticos y  $\beta$ -glucosidasa a 19 y 26°C.

#### 1.7.2. Condiciones que favorecen la infección

o predisposición. - El frío ejerce gran influencia sobre la infección primaria, no obstante su acción frecuentemente muestra discordancias.

GASSNER (1.940) señala que las bajas temperaturas predisponen a la infección, hecho observado por CHAPOT (1.963) en Turquía. PETRI (1.940) negó la hipótesis anterior al observar el "mal secco" en climas atemperados como el de Sicilia, Turquía o La Soukra de Túnez, añadiendo que un invierno frío puede ser un obstáculo para la formación de esporas del patógeno.

GOIDANICH y RUGGIERI (1.949), aceptan que las bajas temperaturas favorecen el desarrollo del "mal secco", considerando que el frío facilita simplemente la penetración del micelio, pero que no constituye un factor necesario para el establecimiento del parásito.

SCARAMUZZI et al. (1.964) realizaron ensayos sobre el efecto de la baja temperatura en el desarrollo de la enfermedad, utilizando plántones de naranjo amargo mantenidos a 0, 5, y 10° C. durante los 10 días previos a la inoculación, observando que la enfermedad se desarrollaba más rápidamente en éstos (especialmente en los mantenidos a 5° C.) que en los testigos mantenidos a 18 - 20° C, al parecer debido al fuerte reemprendimiento del crecimiento ocasionado por la baja temperatura a que habían estado sometidos previamente.

Por la predisposición que ocasiona el mal estado vegetativo, ha sido criticada la práctica del "verdelli", debido a que altera sensiblemente la fisiología del árbol. No obstante, RUGGIERI

(1.940 b, 1.949 a, y 1.931 b) afirma que en Italia, donde particularmente se realiza esta práctica, la enfermedad no es más grave por ello, que en otros países que no la llevan a cabo.

Otros factores que debilitan el árbol son: insuficiencia de prácticas culturales, SAVASTANO (1.921), PETRI (1.927 b) y AJON (1.941), así como su exceso, según estudios de AJON (1.932 d) y CASELLA (1.935), irrigación excesiva, AJON (1.941), nutrición desequilibrada, AJON (1.940).

De igual modo ha sido analizada la composición química y propiedades físicas del suelo como posibles factores que favorecen la infección, si bien PETRI (1.927 b) y RUGGIERI (1.931 a) lo consideran un factor sin importancia incluso en orden de resistencia a la enfermedad. No obstante, en relación al suelo, cabe citar estudios de STEPANOV y CHALICHKINA (1.954) donde sugieren que puede albergar organismos que inhiban el desarrollo del hongo. Asimismo DARSELIA (1.953) señala la existencia en el suelo de bacterias capaces de lisar el micelio.

Otros factores que predisponen a la infección lo constituyen los vientos, RUGGIERI (1.949 a) y las prácticas invernales de arado y abonado, PETRI (1.930 c)

GRASSO (1.973) cita un caso de infección en Sicilia en clementinos, normalmente resistentes, atribuyéndolo simultáneamente a granizadas y frecuentes lluvias del otoño previo, continuado

por un excepcional invierno atemperado, corta edad de los árboles, alta densidad de inóculo existente, inadecuada situación de la plantación y exposición a vientos.

#### 1.8.- Resistencia y sensibilidad específica

En la actualidad, ninguna especie o variedad de agrios parece inmune a la infección de P. tracheiphila, incluso plantas diferentes de las rutáceas si se inoculan de forma adecuada, SALERNO Y CATARA (1.967 a). No obstante, existe una notable tolerancia en Poncirus trifoliata y en la Pamplémusa (C. decumana), seguidos del naranjo dulce, y a mayor distancia del mandarino. Asimismo algunas variedades de limonero están dotados de un grado de tolerancia aceptable, pero raramente presentan simultáneamente buenas características bio-agronómicas, a parte la 'Continella', 'la Flor de naranjo', 'Femminello incappucciato' y algunos clones de limonero 'Monachello'.

Es sabido que en todas las especies de cítricos las plantas jóvenes resultan más susceptibles que las adultas; por otra parte, los clones nucelares de las principales variedades de limonero son más susceptibles que los viejos clones correspondientes.

El estudio de resistencia y susceptibilidad en este capítulo se realiza considerando el origen de la infección, según que

tuviese lugar por vía epígea o hipógea:

1.8.1. Infecciones por vía epígea. - Existen datos bibliográficos sobre susceptibilidad debidos a RUGGIERI (1.948), CHAPOT (1.963), GOIDANICH (1.964), SCARAMUZZI (1965 b), PUNITHA LINGAM y HOLIDAY (1.973). En estos últimos años, con la difusión de nuevos clones de limoneros, se han señalado infecciones naturales o experimentales de "mal secco" sobre diversas especies de agrios, GRASSO y PACETTO (1.971), GRASSO (1.973) y CRESCIMANNO et al. (1.973). Finalmente cabe señalar que SALERNO y PERROTTA (1.966) aislaron cepas del hongo en Sicilia dotadas de diferente virulencia.

Considerando que todas las especies de agrios pueden ser infectadas por el P. tracheiphila, CATARA y CUTULI (1.972) establecieron una escala de susceptibilidad en condiciones naturales, entre las especies y variedades de agrios, sobre la base de infectabilidad de la planta por vía epígea y desarrollo de la enfermedad, respecto al presentado por la variedad de limonero Femminello comune, considerada la más susceptible, distinguiendo tres clases de susceptibilidad: elevada, media y baja.

De elevada susceptibilidad, se consideran las especies o variedades que en condiciones naturales se infectan en un elevado porcentaje (del 50% en adelante) y muestran un desarrollo de la en-

fermedad bastante rápido. Cuando la poda de la parte infectada no se realiza a su debido tiempo, tales plantas mueren generalmente en breve tiempo (1 ó 2 años) o acaban por ser gravemente dañadas, como ocurre con la variedad de limonero Femminello comune. En susceptibilidad media, se incluyen las especies o variedades que se infectan en porcentaje más reducido (del orden del 20 al 40%) y presentan un desarrollo de la enfermedad más bien lento (caracterizado incluso por una detención espontánea de la infección), al punto de intervenir con éxito en la poda. De susceptibilidad baja se consideran las especies o variedades que solo se infectan esporádicamente, y en las que la infección se detiene espontáneamente en breve tiempo; en general tales plantas presentan sólo pocos desecamientos de ramitas.

1.8.1.1. Susceptibilidad y resistencia de las especies de mayor interés comercial:

Limonero (Citrus limon (L.) Burm f.). Es la especie de agrios cultivada más sensible al "mal secco". No obstante, sus variedades presentan diversa susceptibilidad, mostrando en algún caso poca o ninguna susceptibilidad a la enfermedad, RUGGIERI (1.948) GOIDANICH (1.964) y SCARAMUZZI (1965b), como son la Interdonato, RUGGIERI (1931 b) y la Quattrocchi, RUGGIERI (1940 c, 1940 -41) Estas variedades, por presentar ciertas exigencias pedoclimáticas, escasa compatibilidad de injerto con el naranjo amargo y ciertas características de fructificación han visto limitada su difusión. Por el con--

trario, después de las grandes epidemias de "mal secco" de 1.928, una cierta difusión tuvo la variedad 'Monachello', RUGGIERI (1.953c) así como en estos últimos años, a continuación del recrudecimiento de la enfermedad, especialmente algunos de sus clones. (Fot. 6).

Casi todos los clones de la variedad 'Femminello' son susceptibles pero entre la heterogénea población de esta variedad, han sido seleccionados algunos menos susceptibles como el 'Femminello S. Teresa', RUGGIERI (1.956), y el 'Continella', RUGGIERI (1940c, 1941-42), que han encontrado difusión, si bien prácticamente sólo en la zona donde había sido detectados

Otros clones de la variedad 'Femminello' considerados poco susceptibles a la enfermedad son: 'Sinatra', 'Atanasio', 'Garufi', RUGGIERI (1940 c, 1941-42), Lo Porto, CRESCIMANNO y SACCO (1.955) y 'Baddarico' y 'Carrubbaro', SPINA (1.974), que han tenido no obstante una difusión comercial muy limitada, y un clon llamado 'Limone incappucciato' o 'Femminello incappucciato', que tiene una reducida susceptibilidad y características comerciales de fruto aceptables. Plantas de 25-30 años de edad de este clon, raramente presentan sí tomas de la enfermedad. En campo, su susceptibilidad aparece mucho más reducida que la de 'Femminello comune', pero superior a la de la variedad 'Monachello'. Debido a tales características, comienza a tener difusión. Por otra parte, el 'Limone incappucciato' presenta cierta resistencia al frío SPINA (1.974), y por ello la planta ofrece



Fot. 6 .- Plantas de limonero podadas a nivel del portainjerto de  
naránjo amargo , por infeccion de "mal secco" y sobrein  
jertadas con la variedad de limonero "Monachello".



al patógeno menor número de vías de ingreso.

Relativo a los clones nucelares, se realiza una selección de los mismos con objeto de obtener material de propagación exenta de infecciones de virus, por lo que es necesario asimismo, - averiguar el grado de susceptibilidad de las nuevas selecciones en - relación al P. tracheiphila .

CARRANTE y BOTTARI (1.952) observaron el comportamiento de plantones nucelares expuestos a infecciones naturales, encontrando infectados el 15,6% de los pertenecientes a la variedad Femminello y ninguno de la variedad Monachello. KLOTZ (1.953), cita en observaciones preliminares, la posibilidad de una cierta resistencia en clones nucelares. Recientemente, a consecuencia de la difusión de tales clones, se ha observado que ciertas zonas agrícolas muestran en general un elevado porcentaje de infección, y un desarrollo de la enfermedad mucho más rápido que sus correspondientes viejos clones, tanto en la variedad Femminello como en la Monachello. Todas estas observaciones se refieren casi exclusivamente a plantas jóvenes de edad no superior a 10 años.

Diversos autores señalan la conveniencia de encontrar un porta-injerto resistente al "mal secco" que sustituyera al naranjo amargo, RUGGIERI (1.940c, 1.953c) y SALERNO (1.965); no obstante, todavía existen pocas investigaciones experimentales sobre ello; los datos de que se dispone, generalmente se refieren a observaciones

de campo sobre alguna especie de porta-injerto, a parte algunas pruebas de inoculación artificial, RUSSO (1.956 y 1.959) y CRESCIMANNO et al. (1.973). Sin embargo, parece ser que ningún porta-injerto induce en la variedad injertada una resistencia fácilmente apreciable, aunque se ha observado un desarrollo más lento de la enfermedad en la planta de limonero injertada sobre naranjo amargo con injerto intermedio de naranjo dulce o de mandarino, RUGGIERI (1940c)

Pomelo (C. paradisi Macf.). Existen discusiones en cuanto a la susceptibilidad de esta especie. RUGGIERI (1.930), la considera inicialmente como resistente, luego como susceptible, RUGGIERI (1.931b) y posteriormente como de una resistencia elevada, RUGGIERI (1.940c)

CUTULI (1.972) indica haber observado tan solo raramente plantas de pomelo infectadas de P. tracheiphila, tratándose siempre que encontraba una, de desecamientos apicales que tendían a detenerse en corto tiempo. Esto hace suponer que la especie sea poco susceptible a las infecciones a través de los frondes. Este mismo autor añade, que cuando la infección se realiza a través del tronco o del porta-injerto, se pierde el carácter de resistencia, y el patógeno puede difundirse con cierta velocidad incluso en las ramas.

Naranjo dulce (C. sinensis (L.) Osbeck). Todas sus variedades presentan una baja susceptibilidad, RUGGIERI (1.948) y SCARAMUZZI (1.965b) No obstante, en campo se pueden observar

a veces especies en vivero y plantas aisladas con ramitas desecadas a consecuencia de la infección. CATARA y CUTULI (1.972) observaron síntomas de este tipo en plantas jóvenes de naranjo de la variedad 'Biondo'. SAREJANNI et al. (1.952 y 1.953), señalan síntomas graves en cultivos de naranjo en Grecia.

Cabe señalar, que en pruebas realizadas con plantones de naranjo de la variedad Vaniglia inoculadas con diferentes técnicas, SALERNO y CATARA (1.967 b), observaron porcentajes altos de infección de "mal secco". Análogamente, infectando plantas de esta variedad 'Vaniglia' y de la 'Ovale' de 7 - 8 años de edad, obtuvieron defoliaciones y desecamientos con progresión basípeta, si bien no observaron la coloración rosa-salmón en el cilindro leñoso. No obstante, añaden que la infección se fué deteniendo sucesivamente.

En cuanto a los clones nucelares del naranjo, a diferencia que en el caso del limonero, estos no demuestran una susceptibilidad mayor que los clones viejos.

Mandarino (C. reticulata Blanco). Si bien esta especie es generalmente considerada resistente al "mal secco", RUGGIERI (1931b) y GASSNER (1.940), existen indicios de infección en plantas de las variedades 'Avana', 'King' y 'Clementine comune', BATTIATO (1.940 y 1.948), BALDACCI y GAROFALO (1.948), GRASSO y PACETTO (1.971) y GRASSO (1.973). CATARA y CUTULI (1.972) observaron infecciones en implantos comerciales de mandarino 'Avana'

y 'Clementine comune y en plantas aisladas de mandarino de las variedades 'Wilking', 'Clementine di Nules' y 'Clementine Oroval'. Cabe indicar, sin embargo, que las infecciones generalmente se limitan a ramas de uno, o raramente dos años, y causan defoliaciones y desecamientos frecuentemente bien delimitados de los tejidos sanos. En el cilindro leñoso de estas ramas se observa la característica coloración rosa-salmón. Cuando las plantas son dañadas por factores meteorológicos adversos, y en el medio la carga de inóculo es alta (frecuente en caso de plantas asociadas con limoneros), las plantas pueden resultar gravemente afectadas. Las plantas de mandarino infectadas, reaccionan rápidamente con la emisión de numerosos brotes que permiten una fácil reconstitución de los frondes. Por el contrario, causan graves daños las infecciones que se realizan a través del porta-injerto.

RUGGIERI (1953 c) señala que plantones de mandarino de la variedad Cleopatra, son poco susceptibles al "mal secco", diferenciándose claramente de los de naranjo amargo y el no haberse observado nunca plantas muertas por infecciones del hongo. El autor compara el comportamiento de esta variedad de mandarino con el del naranjo dulce.

Bergamoto (C. bergamia Risso et Poit.) . CATARA y CUTULI (1.972) observan, que si bien esta especie es considerada como muy resistente al "mal secco", RUGGIERI (1.948) y KLOTZ

(1.953), en sus experiencias resultó extremadamente susceptible, tanto en vivero como en campo. Añaden que en Calabria, la enfermedad causa graves daños sobre las variedades 'Femminello', 'Fantástico', 'Toruloso' y 'Castaño', causando a veces la muerte incluso a gruesas plantas adultas, y que las plantas en vivero son muy susceptibles a la enfermedad.

Cidro (C. medica L.). En Italia está representado especialmente por la variedad 'Diamante', que resulta muy susceptible a la enfermedad, como ya observó PETRI (1.930), e) Las numerosas lesiones que se encuentran en las plantas a causa de su espinosidad y sensibilidad al frío, facilitan indudablemente las infecciones. En Israel, han sido observadas infecciones sobre la variedad Etrog, REICHERT y FAWCETT (1.930); la misma variedad ha resultado muy susceptible en Sicilia, CATARA y CUTULI (1.972).

Naranja china (C. mirtyfolia Raf.). Es muy susceptible a la infección de P. tracheiphila; la enfermedad muestra un desarrollo rápido en las plantas jóvenes, mientras que en las adultas asume con mayor frecuencia un desarrollo crónico muy lento. En las ramas afectadas el cilindro leñoso presenta una coloración rojo-anaranjado muy intensa.

Naranja amarga (C. aurantium L.). Las plantas jóvenes muestran una susceptibilidad como la del limonero, que disminuye con la edad, atenuándose considerablemente en la planta adulta.

Tal susceptibilidad ha causado y causa todavía la muerte rapidísima de las plantas injertadas sobre este porta-injerto, cualquiera que sea el injerto en el caso de infecciones por vía radical, CUTULI (1.972). Según CALABRESE (1.968), si bien en Italia existen numerosas variedades de esta especie, aunque no todas bien caracterizadas, ninguna de ellas resulta resistente en relación al *P. tracheiphila*, aparte quizá la de flores grandes denominada 'Bouquetier', RUGGIERI (1.948). Incluso variedades de otros países introducidas en Italia, han mostrado una elevada susceptibilidad a las infecciones naturales del hongo, RUGGIERI (1.948).

En pruebas de inoculación artificial efectuadas en cámara climática sobre plántones jóvenes de naranjo amargo, el desarrollo de la enfermedad ha resultado generalmente más lento en los plántones que previamente habían sido inoculados con el virus de la 'variegación infecciosa' o de la 'psorosis gomosa cóncava', SALERNO *et al.* (1.970) y CATARA *et al.* (1.971)

#### 1.8.1.2 Susceptibilidad y resistencia de otras especies del género Citrus:

Numerosas especies de este género, muchas de ellas utilizadas como porta-injerto, son susceptibles a las infecciones naturales del patógeno, RUGGIERI (1.948), *C. junos* Tan., *C. ichangensis* Swing., *C. macroptera* Mont., *C. webberi* Wester, *C. longispina* Wester, *C. pectinifera* Tan., *C. Karna* Raf., *C. jambhiri* Lush., y otras.

A estas se añaden: C. pennivesiculata Tan., C. macrophylla Wester y C. Volkameriana Pasq., esta última especie se mostró en ensayos preliminares muy resistente, RUSSO (1.956 y 1.959). CATARA y CUTULI (1.972) encontraron frecuentemente plantas infectadas en campo. La susceptibilidad de C. volkameriana ha sido por otra parte demostrada en pruebas de inoculación artificial, SALERNO et al. (1.967). El C. macrophylla muestra una susceptibilidad a las infecciones de "mal secco" todavía mayor. Tanto en plántones jóvenes como en plantas de 2 miembros el desarrollo de la enfermedad es muy rápido. CATARA y CUTULI (1.972) observaron infecciones naturales incluso sobre plántones de 3 años de C. pennivesiculata y de C. karna.

En pruebas de inoculación artificial sobre diversas especies de agrios, CRESCIMANNO et al. (1.973), observaron que tanto las especies de Citrus como las de otros géneros son susceptibles al hongo. Entre ellas, la lima mejicana, naranjo amargo, C. indica Tan. y C. pennivesiculata, resultaron las más susceptibles; C. macrophylla, C. taiwanica Tan. et Shimada, C. webberi, daidai una variedad californiana de naranjo amargo, medianamente susceptibles; C. junos, 'rough lemon' y 'shangyuan', escasamente susceptibles.

Otras especies sensibles a la enfermedad son la lima de Palestina (C. aurantifolia Sw.), aparentemente muy susceptible en Israel, REICHERT y CHORIN (1.956), la lima mejicana (C. auran-

tifolia Sw.), ya señalada por RUGGIERI (1.941-42) y la lima de Rangpur (C. limonia Osbeck), RUGGIERI (1.941-42) y CHAPOT (1.963). CATARA y CUTULI (1.972) observaron el comportamiento de esta especie en plantas en colección de 8-10 años, injertadas sobre C. volkameriana, y sobre plantas de la misma edad, constatando que solamente la lima mejicana tiene una susceptibilidad muy elevada a las infecciones naturales, parecida a la del limonero, mientras que la lima de Rangpur presenta solamente alguna rama infectada y la lima de Palestina es muy poco susceptible a la enfermedad.

Infecciones naturales de "mal secco" han sido observadas incluso sobre plantas de lima romana" y de C. junos en Sicilia.

#### 1.8.1.3 Susceptibilidad y resistencia en especies no pertenecientes al género Citrus :

Sobre este tema se han hecho indagaciones, tanto sobre plantas expuestas a infecciones naturales, como sobre plantones inoculados artificialmente. Para el Poncirus trifoliata Raf. se ha observado una baja susceptibilidad al P. tracheiphila, PETRI (1.930 c,e) RUGGIERI (1948) CRESCIMANNO et al. (1.973) y PACETTO, comunicación personal según CATARA y CUTULI (1.972). El patógeno tiene una difusión mas bien lenta sobre los órganos infectados.

CATARA y CUTULI (1.972), señalan plantas de Kumquat (Fortunella spp.) infectadas; algunas de ellas injertadas sobre P. trifoliata, mostraban desecamientos parciales de los frondes y en



algún caso la muerte del injerto. Las ramas presentaban abundantes impregnaciones de goma en el cilindro leñoso y exudados externos después que la rama se había desecado. El aislamiento del P. tracheiphila de los tejidos infectados se obtenía con gran dificultad. En pruebas de inoculación artificial efectuadas en Rusia, esta especie resultó poco susceptible, HOHRYAKOV (1.952). En plantones de Severinia buxifolia (Poir.) Tenore, con desecamientos apicales y etiología sospechosa fué posible aislar el hongo. El desarrollo de la enfermedad en esta última especie parece muy lento.

#### 1.8.1.4. Híbridos diversos:

Plantones jóvenes citrange (P. trifoliata x C. sinensis) como algunas variedades de 'Troyer', 'Yumá' y 'Carrizo', han resultado susceptibles a la inoculación artificial del P. tracheiphila, CRESCIMANNO et al. (1.973). La variedad 'Carrizo' en particular, mostró mayor sensibilidad. En otras pruebas se observó una sensibilidad media en plantones de 'citrange Troyer' inoculados por nebulización foliar, anteriormente heridos o por escisión del cilindro cortical PACETTO (no publicado). En condiciones naturales han sido observadas infecciones medias sobre 'citrange Savage', RUGGIERI (1.948) y 'Troyer', DI MARTINO y RUSSO (c.p.) y CATARA y CUTULI (1.972)

Incluso el 'tangelo' (C. reticulata x C. paradisi) resulta medianamente susceptible al patógeno. Infecciones naturales han

sido observadas sobre las variedades 'Thornton', 'Sexton' y 'Orlando' en 1.972 y 1.973.

También han sido observadas infecciones sobre un híbrido de C. limonum x C. aurantium, BATTIATO (1.940) y sobre limonero cedrado (C. limonimediterranea Lush.)

#### 1.8.2. Susceptibilidad y resistencia en casos de infección por vía hipógea.-

Al ser el naranjo amargo susceptible al "mal secco", las infecciones por la raíz al ser capaces luego de difundirse hacia la parte alta del árbol, no dejan posibilidad alguna de intervención eficaz. Por tanto, su utilización como porta-injerto hace que ni los cultivares de limonero resistentes, ni las diversas especies de cítricos utilizadas como injerto, salven la planta. El factor resistencia puede como máximo determinar un progreso más lento de la enfermedad, evidenciando más marcadamente los síntomas internos de lo que sucedería en caso de una variedad susceptible.

Los casos más frecuentes de "mal nero" se dan además de en naranjo, en variedades de limonero bastante resistentes como es el Monachello, o medianamente resistentes como el "Sta. Teresa" y el "Incappucciato".

CUTULI (1.972), observó casos de "mal nero" en culti

vos de naranjo dulce, de la variedad Tarocco y Washington navel, de 12 años de edad, injertados sobre naranjo amargo, observando mayor porcentaje de plantas infectadas de la variedad Washintong navel que de la variedad Tarocco. Asimismo, dicho autor, cita un caso de infección en pomelo situado en una plantación en que su cultivo se daba asociado a naranjos, así como en bergamoto.

1.8.3. Otras experiencias sobre resistencia en cítricos frente al *P. trahceiphila*

GOIDANICH y RUGGIERI (1947 c) observaron que el jugo extraído de la corteza y leño de naranjo dulce (resistente) y de naranjo amargo (susceptible), estimulaban la capacidad germinativa y de crecimiento del patógeno, no apareciendo diferencias apreciables a este respecto entre ambos jugos.

BALDACCI y GAROFALO (1.949) señalan que la lentitud del proceso patológico en el mandarino constituye la principal diferencia entre esta especie y el limonero, dándose asimismo un apreciable decrecimiento en el rendimiento de los mandarinos infectados.

KLOTZ (1.950) cita la conveniencia de sobreinjertar a nivel del porta injerto variedades sensible, por variedades mas resistentes

HUROSVILI (1.958) estudió el crecimiento de embriones de cítricos en medio artificial, como posible forma de desarrollo en los cítricos una creciente resistencia a heladas y "mal seco". La solución nutriente mas eficaz fué el medio Tukey adicionado de  $B_1$  y  $B_2$  y extractos de plantas; los embriones procedentes de esta solución podían ser transferidos a macetas tras 20 - 21 días. El ácido nicotínico retardó el crecimiento. Los embriones jóvenes crecían mejor a pH 7-7,5 y los mas viejos a pH 5-6,2. Asimismo observó que la temperatura óptima fué de 25 - 27 ° C., siendo necesaria una suave luz difusa, si bien para incrementar la formación de clorofila era necesaria una iluminación directa solar durante 20.30 minutos diarios. Añadiendo toxina del hongo al medio nutritivo, observaron que las concentraciones del 5.10 % no dañaban, pero que mayores concentraciones eran perjudiciales.

KIKACEJSVILI (1.958), observó que de 14 compuestos probados en relación a la susceptibilidad del limonero Novogrzinskij, solamente el  $FeSO_4$  indujo resistencia.

PACULIJA (1.959), asoció la susceptibilidad a daños causados por el hongo con el grado de crecimiento y relativamente con la textura de la madera abierta, indicando que el exámen de la madera podría servir por tanto, para predecir la susceptibilidad de variedades y líneas.

DZANELIDZA y RAZMADZE (1.960), estudiaron la capacidad de resistencia a heladas y "mal secco" en 10 variedades en Georgia, indicando, que en las regiones donde los árboles no mostraban daños severos por estos factores, podía ser aconsejable el uso de las variedades "Novogruzinskij", "Villafranca", "Udarnik" y "Genoa", pero donde presentaba mayor gravedad podría ser mas eficaz el limonero Meyer.

KOLELISVILI (1.962) describe algunos híbridos obtenidos por cruzamiento de limoneros con varias especies de cítricos y Pocirus trifoliata, señalando que el cruce con formas silvestres aumenta la resistencia a las heladas.

FATTA DEL BOSCO (1.963) indica que la variedad de limonero "Femminello" produjo en un brote una mutación que dió frutos con protuberancia, otros daban hojas amarillas y variegadas y también una raza con frutos con semilla y buena resistencia a la enfermedad. Asimismo obtuvieron naranjos, limoneros y tipos intermedios de frutos por injerto híbrido de limonero x naranjo.

DONADZE (1.966) estudió la resistencia al "mal secco" en varias especies de cítricos, observando que el orden decreciente de éstos respecto a ella fué: mandarinos, naranjos, toronjas y limoneros. De las variedades de mandarino, la mas resistente mostró ser 'Skorospelka' (Early Fruit), 'Kovano-Vaae' y 'Local unshiu'. De nueve variedades de naranjo, presentaron una resistencia

parcial 'Washington Navel', 'Hamlin', 'Local Large Fruited' y 'Grizinskij' (Georgia). Ninguna variedad de 'pamplemusa' fué resistente o parcialmente resistente.

LARKHOUSA et al. (1.966) realizaron ensayos sobre combinaciones injerto-portainjerto en relación a la resistencia al "mal secco".

SALERNO et al. (1.967) observó que el C. Volkameriana era susceptible al "mal secco", pero menos que el naranjo amargo. Sin embargo una raza del hongo era débilmente patogénica al naranjo amargo y virulenta al C. volkameriana. La última especie demostró ser susceptible a las virosis de tipo psorosis (gomosis cóncava, blind pocket), impietratura, enfermedad del stubborn y particularmente de la madera amarilla, siendo aparentemente tolerante a cristicortis, exocortis y tristeza.

PINKAS et al. (1.968) estudiaron los mecanismos de resistencia de variedades de mandarinos frente al patógeno. De dos variedades, 'Cleopatra' y 'Avana', aislaron 5 flavonas, que identificaron y de las que probaron su actividad fungistática. Cuatro de ellas se mostraron potentes, una de ellas, la : 5,4'-dihidroxi-6,7,3'-tetrametoxi flavona, es un nuevo compuesto, mientras que la segunda: 5,4'-dihidroxi flavona, es notificada por primera vez en cítricos

DEMETRADZE y DZANELIDZE (1.970), señalan el "mal secco" como la enfermedad mas grave de Turquía. El porta-

injerto de limonero 'Interdonato' y C. volkameriana son susceptibles en Turquía aunque tolerantes en Sicilia. La variedad de limonero 'Lamas' no se observa afectado por la enfermedad.

DONADZE (1.970), en una plantación mixta de limonero Novogruzinskii, mandarinos 'Unshiu' y naranjos 'Washington Navel' más del 88,2 % de limoneros, 13,9 % de mandarinos y 11,9 % de naranjos fueron afectados por la enfermedad.

TOKHADZE (1.971) observó que la cantidad límite de agua contenida en hojas de cítricos estaba relacionada directamente con el grado de resistencia a heladas y "mal secco", y el contenido de agua libre inversamente. El déficit de agua durante el otoño e invierno en el limonero Villafranca, era atribuido a la transpiración y a la incapacidad radical de compensar esta pérdida. La proporción de agua límite a agua libre en 'satsuma' y Citrus junos era dos veces la de limonero 'Villafranca', y ello sucede por la baja resistencia del limonero a la helada.

GOLIADZE et al. (1.971) indicaron que en Georgia, en una variedad de limonero susceptible infectada artificialmente, el porcentaje de células muertas en el cambium, floema o médula, variaron entre 40-60, pero en el cv resistente Meyer sólo fué del 9 - 19.

DEMETRADZE et al. (1.972), observaron que los contenidos en N y carbohidratos de las hojas de limonero 'Villafranca' susceptible a las heladas y "mal secco" fueron

significativamente mas altos de junio a diciembre que en otras especies de cítricos estudiadas . En 'satsuma' resistente a heladas y "mal secco" , los contenidos en nitrógeno y carbohidratos fueron mas altos solamente en los meses de invierno y primavera , siendo observado un comportamiento similar en otras especies resistentes a heladas y "mal secco" , como limonero 'Meyer' , naranjo 'Washington Navel' y Citrus junos. Los contenidos en proteína , nitrógeno proteínico y total , fueron significativamente mas bajos en hojas de limonero 'Villafranca' que en otras especies.

GOLIADZE (1.972 a ) , para probar la presencia de sustancias fitoncicales en limoneros , aplastó hojas de la primera , segunda y tercera brotación y de la crecida del año precedente , estudiando su efecto sobre el hongo . Las sustancias fitoncicales de las tres brotaciones inhibieron el desarrollo del hongo durante 4 días , mientras que las de las hojas de los años previos , así como las de las hojas inmaduras , fueron menos efectivas . La actividad fitoncical de las hojas recogidas por la mañana fué mayor que la de las recogidas al mediodía o por la tarde . No observó correlación entre la presencia de antocianina en las hojas y su actividad fitoncical.

CHAPOT (1.972 ) señala que los cvs de limonero menos susceptibles son 'Monachello' , 'Interdonato' y algunos clones



de 'Femminello' y 'Lamas' .

GOLIADZE (1.972 c ) , en estudios de hibridación intraespecífica de cvs de limonero susceptible al "mal secco" con otras variedades susceptibles , observó el menor porcentaje de infección (24,5) en el híbrido 'Villa Franca' x 'Novogruzinski'. Con cruces de cvs resistentes x susceptibles , la tasa mas baja de infección (11,3 ) , se dió en 'Meyer' x 'Poliploide No. 1', y en el cruce entre cvs resistentes 'Meyer' el porcentaje fué del 0,5 % . Con híbridos inter-específicos , el menor porcentaje de infección (9%) se dió en el cruce 'Meyer' x Citrus ichangensis y con híbridos intergenéricos en Meyer x Poncirus trifoliata (0,9).

GOLIADZE y TIKANIDZE (1.972) observaron que la nitroetilurea (1: 16.000) y nitrometilurea (1: 10.000) estimularon la resistencia al "mal secco" en plantones de limonero , siendo esta mas pronunciada en poliploides y plantas nucelares . Discuten asímismo el mecanismo de resistencia a la enfermedad.

GOLIADZE (1.972 b) realizó una discusión sobre procedimientos de crianza . De 10 cvs provadas , los plantones 'Meyer' obtenidos por polinización libre , mostraron ser los menos susceptibles , seguidos de 'Monachello'.

KASHKASVILI (1.972) observó que los plantones nucelares y zigóticos procedentes de semillas híbridas en las que el macho parental era limonero 'Meyer' , eran mas resistentes al "mal secco" que los procedentes de otras semillas híbridas . Los plantos nes zigóticos fueron mas resistentes que los nucelares.

### 1.9. Terapéutica. -

1.9.1. Métodos preventivos. - En la elección del portainjerto, RUGGIERI (1.949 a) sugiere la conveniencia de injertar el naranjo amargo en vivero y posteriormente llevarlo a la plantación. NESTERENKO (1.954) cita que el portainjerto debe ser al menos de 10 mm. de diámetro por encima de 5 cm. del suelo.

En la elección de especies, CHAPOT (1.963) propone reemplazar en lo posible el limonero por el mandarino y naranjo que son menos sensibles, o bien restringir su cultivo a las variedades menos sensibles localizando las restantes en áreas exentas del patógeno.

En relación a las técnicas de cultivo, RUGGIERI (1953 e) sugiere realizar las labores profundas y abonados al inicio del verano para evitar la contaminación por la raíz.

Es sabido que las infecciones radicales se efectúan cuando estas se ponen en contacto con partes de plantas enfermas, como hojas y ramitas infectadas, lo que es particularmente facilitado por las técnicas de labranza.

Según CUTULI y SALERNO (1.976), subsiste todavía la costumbre de realizar las labores del terreno en otoño, con el fin de aumentar el tamaño de los frutos, o de la mitad del otoño al final del invierno para efectuar el abonado, exponiendo así al árbol a las graves infecciones radicales que constituyen las dos formas de "mal secco" conocidas por "mal nero" y "mal fulminante", en relación a la profundidad de la infección en los cercos leñosos y que

llevan a la muerte a la planta en un tiempo más o menos breve.

Estos mismos autores prosiguen indicando, que en las zonas donde la enfermedad tiene carácter epidémico, no es conseja ble la práctica del sistema de "no cultivo", ya que con el tiempo - ocasiona el que los capilares radicales asomen a la superficie faci litando así la infección radical. De igual forma consideran más pe ligroso el paso de uso del sistema de "no cultivo" al de "cultivo", especialmente en el periodo de otoño-invierno en que la posibilidad de infección es grande en relación al elevado número de lesiones debidas a la destrucción de las raíces desarrolladas a nivel del sue lo. Finalmente, citan, que la técnica de cultivo que más facilita la infección es la afortunadamente poco usual, de incrementar la do tación orgánica del terreno enterrando en él las partes pequeñas procedentes de la poda, en la que queda incluido el material infec tado, y la de la desconchadura del árbol para el suministro de sus tancia orgánica.

La plantación de nuevos cultivos se considera más con veniente de efectuar al final del invierno, para evitar este periodo favorable al desarrollo del hongo.

Es aconsejable la protección que ejercen los cortavien tos evitando heridas particularmente en la época fría, que según RU GGIERI (1.953 b) son vías de contaminación.

En relación a la poda otoñal para reducir el inóculo,

CUTULI y SALERNO (1.976) consideran que el "mal secco" durante el año presenta manifestaciones de diversa intensidad. La explosión de síntomas de la forma más acentuada se presenta en primavera y persiste hasta la llegada de los calores estivales, volviendo a desarrollarse nuevamente hacia el final del verano e inicio del otoño; la duración de tal reemprendimiento está condicionada por el clima, que determina la duración del ciclo vegetativo estivo-otoñal. En este periodo, las ramas atacadas aún si son en número inferior al presente en el periodo comprendido entre la primavera y el inicio del verano, resultan más perjudiciales en relación a la transmisión de la enfermedad de una planta a otra, ya que por una parte las fructificaciones del patógeno responsables de las nuevas infecciones, son más abundantes sobre las ramas enfermas y tienen mayor posibilidad de supervivencia; por otra parte, las plantas se encuentran en un estado de elevada sensibilidad a la enfermedad.

Por este motivo, continúan señalando estos mismos autores, debe ser considerada con mayor atención la poda de las ramas enfermas y la quema de las partes cortadas. Indicando, que abandonar a otros periodos tales prácticas puede acarrear la pérdida de las plantas enfermas, y no considerar la planta en otoño, puede además de comprometer definitivamente el árbol atacado, significar la difusión de la enfermedad a árboles sanos.

La desinfección de heridas se lleva a cabo mediante

un anticriptogámico. NACAIDZE y TALAKVADZE (1.958), obtuvieron eficacia con una pasta de lanolina que contenía 2,4-D.

En la desinfección de útiles es efectivo un baño fungicida, como sulfato de Cobre al 5%.

El tratamiento de árboles sanos es eficaz para prevenir la contaminación, especialmente en los que presentan discontinuidades en su exterior.

En relación a las causas de decaimiento a evitar, CROSSA-RAYNAUD (1.960 a) en Túnez, considera la irrigación con aguas salobres como posible forma de extensión del "mal secco".

Referente al "Verdelli", en las regiones donde es aplicado al limonero, es aconsejable limitar esta práctica a las variedades tardías. RUGGIERI (1.949 a) señala contraindicaciones respecto a los limones recogidos en primavera por las heridas que se ocasionan al árbol.

Relativo al control de semilleros, la generalización del "mal secco" sobre el naranjo amargo utilizado como portainjerto, ocasiona una contaminación considerable en viveros; las plantas injertadas constituyen un grave peligro de extensión de la enfermedad, RUGGIERI (1.953 c).

1.9.2. Métodos curativos. Solamente se conocen moderadores del desarrollo de la enfermedad.

Terapeutica quirúrgica. Se aplica cuando las infecciones se realizan por vía epígea. La época de intervención y rapidez son importantes. RUGGIERI (1.953 e), indica que la zona de corte de la rama infectada debe realizarse algunos centímetros por debajo del límite de coloración típica de la madera, debiendo efectuarse la intervención según FEDORINTCHIK (1.953 a) en los 8-10 días posteriores a la caída de la primera hoja. (Fot. 7).

Si la infección tiene lugar por la raíz o cuello del árbol, éste debe ser arrancado y quemado, cualquiera fuera su edad. Cuando los árboles son viejos y presentan una rama principal afectada, esta le deberá ser amputada entera.

CUTULI y SALERNO (1.976) indican, que si bien la poda fué la primera práctica de control de la enfermedad y persiste por su eficacia, no siempre se efectúa adecuadamente y que incluso realizándola convenientemente tiene su contrapartida, especialmente en casos como el de podar ramas grandes que además de suponer una pérdida económica, revigoriza la planta, lo que ocasiona una veloz evolución de la enfermedad aún en las partes sanas. Por tanto, interesa que la planta permanezca con un vigor vegetativo medio para aminorar el avance del patógeno, lo que se obtiene podando lo menos posible y reduciendo el abonado nitrogenado, lo que se asegura restando las buenas suministraciones de P y de K.

Imprescindible para la eficacia de este tipo de control,



Fot.7 .- Ejemplo de terapéutica quirúrgica , aplicada sobre plantas de limonero afectadas de "mal secco".

añaden estos mismos autores, que se deben sacar de la plantación las partes podadas infectadas y quemarlas para que no sirvan de fuentes de infección a otras plantas . Asimismo , señalan como aspecto negativo , el mutilar los árboles eliminándoles todas o casi todas sus ramas , lo que ocasiona que los árboles permanezcan años entre la vida y la muerte , emitiendo hasta el total agotamiento brotes vigorosos sobre los que se desarrollan de forma preferente y en número elevadísimo fructificaciones del hongo . En estos casos , la única finalidad del árbol mutilado de esta forma , es la de difundir el patógeno . .

Según CUTULI (1972), en el "mal nero", tras la poda de ramas afectadas , la planta puede reaccionar emitiendo escasa vegetación que se marchita en breve tiempo ; sobre el tronco , por el contrario , se producen brotes vigorosos hasta que el parásito alcanza los círculos mas externos del leño . Ineficaz resulta podar la planta a la altura del tronco , por difundirse la infección en sentido acrópeto .

Terapéutica externa. Casi todos los anticriptogámicos son activos . De los compuestos de cobre , es particularmente activo el caldo bordelés , Zn-Cu , sales orgánicas de Hg , etc. RUGGIERI (1953 a , 1956) y KLOTZ (1953) . AJON (1941), resalta la pulverización frecuente invernal de los árboles con sulfato de cobre . En viveros , especialmente de naranjo amargo , es eficaz el tratamiento mensual de caldo bordelés al 3% , antes del inicio de la vegetación,



prosiguiéndose sus aplicaciones, sucesivamente, al 1% al final de la floración y en agosto-septiembre, y al 3% tras la cosecha. En viveros, aconseja dos tratamientos de caldo bordelés al menos, uno al 1% tras el primer periodo vegetativo y otro al 2% en octubre--bre-noviembre.

Realmente el control químico encuentra su base científicamente válida, cuando se conoce el periodo de las infecciones ordinarias del "mal secco".

RUGGIERI (1.956) señala que infecciones iniciales de plántones de naranjo amargo se presentan solamente cuando las plantas están en el periodo de actividad vital menos intensa, particularmente en enero; siendo más acentuadas en inviernos húmedos que secos. Indica asimismo que las pulverizaciones con el 1% de Caffaro en agua, aplicadas 4 veces de octubre a enero, redujeron la infección del 43% al 1,2%, sin originarse defoliaciones. Entre las variedades de limonero, la de Femineello clon Santa Teresa es considerada particularmente resistente y preferible a la Monachello. Asimismo el autor vislumbra prometedora la resistencia del porta-injerto del mandarino Cleopatra y Citrus volkameriana

SALERNO et al. (1.976) indican que el conocimiento del periodo de las infecciones ordinarias primarias de "mal secco" se deben a RUGGIERI (1.956), que asimismo realizó después experiencias de control con tratamientos foliares utilizando anticriptogámicos; con oxiclورو de cobre efectuando 4 tratamientos distan-

ciados un mes , de últimos de octubre a febrero, observaron buenos resultados a pesar de la toxicidad del cobre que ocasionaba ya defoliaciones al tercer tratamiento.

SALERNO y CARTIA (1.965 , 1.967) en pruebas "in vitro" , en cámara climática y campo , con plántones de naranjo amargo expuestos a infecciones naturales , observaron los mejores resultados con 'ziram' , 'faltano' y 'oxicloruro de cobre' .

SOMMA et al. (1.969) en tratamientos de campo ensayaron también 'ziram' , 'faltano' y 'oxicloruro de cobre' , confirmando la eficacia del 'ziram' y 'oxicloruro de cobre' , señalando que a pesar de la toxicidad del cobre , es aconsejable el 'ziram' en tratamiento foliar.

Terapéutica interna. PETRI (1.932 b ) consideró que la absorción por las raíces y la concentración de mercurio en los vasos , puede ocasionar una ausencia de infección debido posiblemente a una acción estimulante sobre los tejidos . Según RUGGIERI (1942) la acción del sulfato neutro de ortoquinoleína solamente había sido estudiada en pulverización , pero no en el aparato circulatorio. El aporte de manganeso , especialmente en forma de bióxido al suelo y su absorción por el árbol como remedio circunstancial frenador de la expansión de la enfermedad fué discutido por CASELLA (1.935 , 1.936) y RUGGIERI (1.936 a , b) .

Con los fungicidas sistémicos se han impulsado las investigaciones de control , entre las que figuran trabajos de ELIA (1.969) PERROTA et al. (1.970) , THANASSOULOPOULOS (1.969) y SOMMA y SAMMARCO (1.971).

SALERNO y SOMMA ( 1.971) , han dedicado especial atención al Benomyl , realizando pruebas en cámara climática y pleno campo , acompañadas de ensayos biológicos , observando , que el tratamiento mas efectivo es el aplicado al terreno antes de la inoculación.

SOLEL y PINKAS ( 1.972) efectuaron bioensayos para evaluar las propiedades sistémicas del 'carboxin' , en viveros de limoneros, observando en la raíz de edtos un contenido en 'carboxín' procedente de la solución acuosa y tratamiento al terreno , así como una traslocación a tallos y hojas , siendo el contenido en las hojas menor que en la raíz , contenido que aumentaba al remover la cera cuticular . El carboxín , observaron que fué marcadamente tóxico al P. tracheiphila utilizado en el ensayo.

SOLEL et al. (1.972) , evaluaron fungicidas sistémicos y aceites auxiliares , observando en un ensayo preliminar , que el 'carboxín' y la 'cicloeximida' a 2 ug/ml. previnieron la germinación de conidios. Las pulverizaciones aplicadas con anterioridad a la inoculación , eran mas efectivas que las aplicadas posteriormente . La severidad de la enfermedad fué reducida por suspensión acuosa de 'Benomyl' , así como por pulverizaciones foliares , encontrando

que el 'tiabendazolo' y 'carboxín' , fueron inefectivos.

Asímismo estos autores , señalan que las aplicaciones al terreno con soluciones de 'cycloeximida' , 'semicarbazone' , 'benomyl' , TBZ y ' oxicarboxín' , previnieron el desarrollo de la enfermedad en plantones de 'Rough lemon' , inoculados inmediatamente después del tratamiento. La adicción de aceites minerales en pulverizaciones acuosas de TBZ y 'carboxín' , aplicadas folaramente , mejoraron considerablemente su acción , quizás por aumentar el contenido . Al suministrar a las plantas el 'carboxín' con aceites minerales insolubles en una zona de la base del tallo , el desarrollo sistémico de la enfermedad , fué interrumpido a continuación de la inoculación , sobre el punto de aplicación .. Por último señalan que la evaluación de TBZ y carboxín con aceites en plantones infectados de limoneros , se justifica en base a estos resultados.

SOMMA et al. (1.974) , continuaron el estudio del Benomyl en tratamientos foliares polienales , en cultivos de limoneros infectados de forma natural . La efectividad obtenida en estas pruebas ha permitido establecer un calendario de tratamientos para obtener la máxima eficacia del producto , lo que ha sido obtenido anticipando el inicio de los tratamientos a la 1ª mitad de septiembre , con el fin de tener una elevada concentración de producto en la planta en correspondencia al periodo de infección .

DE CICCIO y LUISI (1.975) , estudiaron la influencia de aceites minerales blancos de diversa viscosidad en el Benomyl , Me

tiltiofanato y algunos derivados bencimidazólicos, en el control de la enfermedad en cámara climática, concluyendo que en el tratamiento al tronco el aceite permitía un mayor acúmulo de fungicida en la planta, particularmente en la corteza, añadiendo, que en los ensayos de control los aceites también aumentaban la eficacia de los fungicidas. En el tratamiento foliar con Benomyl, el aceite también aumentaba su acúmulo en la planta y eficacia en el control, particularmente con el aceite de menor viscosidad, que asimismo en general consideran -- más efectivo.

LUI SI et al. (1.976) realizaron pruebas de control con tratamientos foliares y al terreno, aplicados 15 días antes de la inoculación realizada respectivamente al tronco y hojas, resaltando una mayor eficacia del Benomyl, y en segundo lugar del Metiltiofanato, justificando su control por los resultados obtenidos en los ensayos de sistemicidad.

No se conocen estudios de la Triforina sobre el "mal secco", por lo que hemos iniciado su estudio en la segunda parte de este trabajo. No obstante, diversos autores han realizado ensayos con la misma, si bien en muchos casos han llegado a resultados contradictorios. Asi, cabe citar, que SCHIKE y VEEN (1.969), la encontraron particularmente activa frente al mildew, ácaros, tizones y roña de la manzana, señalando que los tratamientos a la raíz, eran más efectivos que los foliares en la protección del centeno frente

al mildew y del trigo frente al atizón; dichos resultados difieren con los de FUCHS et al. (1.971) y la diferencia de efectividad entre un tipo de tratamiento y otro varía de unos casos a otros a concentraciones comparables.

Asimismo FUCHS et al. (1.970), realizaron pruebas "in vitro" sobre la actividad de la Triforina frente a germinación de conidios de Aspergillus niger y Cladosporium cucumerinum, así como frente al crecimiento micelial de una serie de hongos patógenos y no patógenos, observando en bioensayos cromatográficos de capa fina, una acción fitotóxica frente a la germinación de esporas y crecimiento fungal. Todos estos resultados a su vez, contrastan con los de SCHICKE y VEEN (1.969) en Erysiphe graminis, que indicaban que para llegar a ser activa la Triforina, necesitaba que la planta viva la metabolizara. Otros resultados de FUCHS et al. (1.970) indican que el producto de la planta es rápidamente metabolizado en metabolitos no fitotóxicos.

1.9.3.- Otros ensayos sobre el control de P. tracheiphila.- RUGGIERI (1946 b) señala que el control por pulverización no es satisfactorio, recomendando como medidas de control la poda de ramas y portainjertos infectados y su destrucción fuera de la plantación, así como efectuar las técnicas de cultivo y abonado pro-

fundos, realizándolas preferiblemente en verano a invierno y primavera, así como el uso de las variedades resistentes.

RUGGIERI (1.948), incluye entre las medidas de control la pulverización de semilleros y de los árboles jóvenes en los primeros años con un fungicida, así como la terapéutica quirúrgica.

STEPANOV (1950 a) aconseja como medida importante de control, sacar fuera de la plantación las partes infectadas podadas y destruirlas, así como la desinfección de la hoja de corte del instrumento usado, y la aplicación a continuación de una mezcla de caldo bordes a los árboles infectados y a sus próximos.

FEDORINIK (1953 c) señala como control preventivo la poda de ramas infectadas.

RUGGIERI y GOIDANICH (1.953) señalan entre las medidas preventivas de control, la fertilización y cultivación profunda - tardías, realizándolas a finales de invierno o primavera temprana, para reducir las lesiones a las raíces, o al menos realizarlas en una época desfavorable al desarrollo del hongo, así como aconseja la pulverización profiláctica. Indica también la poda de ramas infectadas y descortezamiento de las áreas del árbol en que la madera se muestra descolorida. Sugiere asimismo la reconstitución de la plantación del limonero afectado con la variedad resistente Monachello.

ROMANO (1.957) señala que el griseofulvin mostró una fuerte acción fungiestática "in vitro" a 40 unidades por c.c., no siendo

efectivo en experiencias con plantones de cítricos.

FEDORINCIK (1.961), entre las medidas de control incluye , frecuente inspección , poda y destrucción de ramas infectadas y la pulverización con mezcla bordelesa al 3 %.

SCARAMUZZI (1.965) realizó una revisión con especial referencia a los efectos de la temperatura sobre la enfermedad y su control por fungicidas , observando como mas efectivo el ETM.

THANASOULOPOULOS (1.969) realizó pruebas "in vitro" e "in vivo" con plantones de naranjo amargo , indicando una posible acción fungistática del Benlate sobre el desarrollo del "mal secco".

MKERVERALI y DZIMISTARISHVILI (1.971) probaron 6 antibióticos , observando que solamente biomycin y gramicidin impidieron el desarrollo del patogeno y la exudación de su toxina ; furacilín solamente impidió la exudación . De otros 8 compuestos probados , norsulphasol , urosulfán y tesán , fueron tóxicos para el micelio y el ácido fólico y norsulphasol , fueron tóxicos para las esporas. La introducción de cloruro de mercurio ( $^{203}\text{Hg}$ ) o sulphidine ( $^{35}\text{S}$ ) dentro de un limonero de tres años , prolongó su vida.

KIKACHEISHVILI et al. (1.972) en pruebas de control aplicaron a limoneros quelatos (no definidos) de OP-M-Fe-Mn, o , Fe-DTPU al 40-50 ml/árbol; los resultados obtenidos en relación al control y observados dos meses después de la infección artificial , mostraron que los árboles tratados no presentaron síntomas de enferme-



dad , mientras que el 20 % de los árboles del control murieron . En tratamientos en campo , los árboles con infección natural que habían recibido quelatos de OP-M-Fe-Mn a 20-30 ml/árbol cada año antes del inicio del tratamiento , no mostraron síntomas de la enfermedad durante 4 años , mientras que los árboles de control que recibieron algo no líquido , mostraron el 30 ,7 % infección y el 20 % se perdieron. En otros ensayos , plantas tratadas con cada quelato al 40-50 ml/árbol , mostraron resistencia al "mal secco" en el segundo y tercer año después del tratamiento.

CHAPOT (1.972) da una serie de medidas de control o prevención de la enfermedad.

UTURGAURI et al. (1.973) inyectaron en árboles sanos e infectados de "mal secco" alcohol alílico, Melprex (dodine) o una solución del cultivo del patógeno , determinando sus efectos sobre la fotosíntesis . Los resultados fueron tabulados , observándose que los tratamientos generalmente inhibieron la fotosíntesis.

### 1.11 Características generales del "mal secco"

El "mal secco" es una infección vascular (traqueomicosis) de los cítricos. Su gravedad es tal que si no es oportunamente controlada, puede llegar a destruir plantaciones enteras de limonero. Afecta en segundo lugar al naranjo amargo. Otras especies de cítricos pueden ser también infectados. Presenta una sintomatología externa poco específica, los síntomas típicos consisten en la clorosis de las nerviaciones foliares y subsecuente caída de las hojas de los brotes, originándose por último el desecamiento y muerte de tallos y ramas. Como síntoma inicial de la enfermedad se puede considerar el rápido desecamiento y muerte de las hojas. Su principal síntoma interno es una decoloración de la madera infectada que aparece al efectuar cortes en ella (antes del desecamiento y muerte de la corteza) color rosa-salmon, o amarillo-anaranjado del tejido vascular, que posteriormente vira a castaño y castaño oscuro. La epidermis del huésped cuando se encuentra recubriendo los picnidios asume una apariencia ceniza.

El agente causal de la enfermedad es un hongo microscópico perteneciente a los Deuteromicetos Sphaeropsidales, descrito por PETRI en 1.929 como Deuterophoma tracheiphila Petri.

El hongo en cultivo presenta las siguientes características : los conidios se producen libremente sobre las hifas. Los conidioforos - pueden ser semi-macronematous, mono-nematous, simples y a veces ramificados. Las células conidiógenas pueden ser monophragmidie, integradas, y presentan forma de botella a lageniforme ; estan determinadas con collaretes bien definidos. Los conidios se presentan en agregados formando cabezas mucosas; se originan semi-endogenamente, y son simples, unicelulares y rectos con extremos redondeados, midiendo  $2 - 2,5 \times 1 - 1,5$  u, con una gotita en cada extremo.

El patógeno penetra en la planta a través de los estomas o heridas e invade fácilmente los elementos vasculares, extendiéndose a través del xilema a quien causa estrías de color rojizo, y donde permanece hasta que los órganos afectados decaen. Según el modo de infección, el desecamiento se puede iniciar en un sector o en varias partes del árbol. Asimismo, la velocidad del proceso de la enfermedad está ligado al origen de las infecciones. De esta forma, debido a viejas infecciones por la base del tronco del árbol, o a través de las raíces principales ("mal fulminante") puede producirse un súbito desecamiento de ramas enteras o árboles. Si la infección tiene lugar por las partes altas del árbol, el proceso de desecamiento de hojas y ramas es mas lento.

Las prácticas culturales pueden ocasionar heridas especialmente en las raíces y cuello de los árboles, facilitando la infección, por lo que conviene realizarlas hacia el verano en que en el medio ambiente existe menor cantidad de inoculo, ya que la enfermedad es mas severa en otoño e inicios de la primavera, decayendo con las altas temperaturas estivales. El agua fría puede ocasionar severos daños a los árboles, predisponiéndolos a la infección. La temperatura óptima para el crecimiento de los picnidios es de 20 a 25 ° C. Una forma especial de transmisión del P. tracheiphila, es mediante el agua contaminada con residuos provenientes de una planta enferma. Los síntomas externos pueden ser observados 2 - 3 semanas después de la infección de conidios en el interior del injerto. Se vienen realizando trabajos sobre la influencia de las virosis de los cítricos en el desarrollo de la enfermedad, transpiración en el huésped y composición en aminoácidos de las paredes celulares del hongo. Los metabolitos tóxicos excretados por el hongo están implicados en la patogénesis.

Algunos cvs. de limonero son resistentes, recomendándose generalmente el uso de injertos resistentes. Son muy susceptibles al patógeno : C. aurantium, C. grandis, C. medica y "rough lemon". Son especies resistentes : C. aurantifolia (algunos cvs), C. reticulata, C. sinensis, y C. volkameriana. En man

darino, se presentan sustancias funguicidas.

En el control de la enfermedad han sido utilizadas pulverizaciones de cobre, pero mas recientemente son aconsejados los fungicidas orgánicos (ej. , ziram y phaltam). El Actidione se ha observado efectivo en el control de plantones de "rough lemon". Benlate, Thiabendazole y Enovit, inyectados en limoneros detienen el desarrollo de la enfermedad; el Benomyl aplicado al terreno antes de la inoculación del patógeno, suprime el desarrollo de los síntomas. Recientes resultados con Thiabendazole y Carboxín, justifican su evaluación como preventivos en tratamiento al tronco y hojas.

En cuanto a su distribución geográfica, la enfermedad se encuentra en áreas del Mediterráneo y Mar Negro : Argelia, Chipre, Francia, Grecia (incluyendo Creta y las Islas Egeas), Israel, Italia (incluyendo Cerdeña), Líbano, Siria, Túnez, Turquía y URSS (Georgia y Caúcaso). En la actualidad, los países de la Cuenca Mediterránea que aparecen libres de la enfermedad son : Marruecos, Portugal y España. Existen noticias sobre su existencia en Colombia y Uganda, si bien requieren confirmación.

ESTUDIO DE DOS NUEVOS  
FUNGICIDAS SISTEMICOS

El "mal secco", constituye uno de los problemas fitopatológicos principales en el cultivo de los agrios, particularmente del limonero en muchos países de la Cuenca Mediterránea.

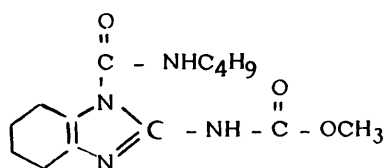
El control químico de esta enfermedad, parece poder ayudarse con intervenciones mensuales aplicadas en el periodo de tiempo comprendido desde la mitad de septiembre a febrero, con productos sistémicos, particularmente Benomyl y Metiltiofanato, SALERNO e SOMMA (1.971), SOMMA et al. (1.974), CUTULI y SALERNO (1.976), limitados todavía a sus aplicaciones en campo, debido a su elevado precio. Asi pues se intenta reducir las dosis de aplicación, estudiando la utilización de substancias auxiliares, SOMMA y SALERNO (1.973), DE CICCIO y LUISI (1.975), y se ensayan otros compuestos que pudieran resultar mas eficaces o menos costosos, LUISI et al. (1.976). Por éste último propósito han sido ensayados dos nuevos fungicidas de actividad sistémica: Triforina y Thiocur.

Asi pues, la eficacia que los fungicidas sistémicos vienen demostrando, especialmente en el control de enfermedades vasculares, entre las que figura la traqueomicosis que caracteriza el "mal secco", es el motivo que nos ha llevado a plantear una serie de ensayos encaminados a evidenciar la actividad de dos nuevos fungicidas de este tipo en el control de la enfermedad.

Las diversas pruebas "in vitro" y en cámara climática realizadas, tenían por finalidad averiguar las fungitoxicidad, fitotoxicidad, sistemicidad y actividad de control de los productos en estudio.

El Benomyl (Benlate al 50% de principio activo) es un metil carbamato metil-1-(metilcarbamil)-2-benzimidazolcarbomato, o, ester metílico del ácido 1-butilcarbamil- 2-benzimidazol carbámico.

Fórmula estructural:



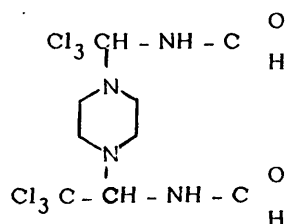
Fórmula empírica: C<sub>14</sub> H<sub>18</sub> N<sub>4</sub> O<sub>3</sub>

El producto comercial, Benlate, fué proporcionado a - mablemente por la Soc. Du Pont de Nemours.

El producto comercial correspondiente a la Triforina, es - taba formulado al 19,4 % de principio activo. La Triforina es la N, N' - bis - (1 - formoamido - 2,2,2 - tricloraetil)-piperacina.



Fórmula estructural:



Fórmula empírica:  $\text{C}_9 \text{H}_{14} \text{N}_4 \text{O}_2 \text{Cl}_6$

Originariamente la Triforina (CELA W 524) fué obtenida por C.H. Boehringer Sohn en forma pura cristalina y como concentrados emulsionables del 10 y 20%, respectivamente.

El producto comercial de la Triforina, fué amablemente proporcionado por Margesin, S.p.A. - Celamerck.

Del Thiocur (ex RH-3928), durante el periodo de experimentación no se conocía su composición, posteriormente ha resultado tratarse de un formulado al 51 % de principio activo : metil-2-(2- furanilmetileno) amino fenil amino tiosimetil carbamato .Que fué amablemente proporcionado por la Rhom and Hass Italia, S.p.A

### 2.1. Pruebas "in vitro"

Tenían por finalidad determinar la actividad de los fungicidas en estudio frente al crecimiento de colonias de P. tracheiphila, siendo los productos aplicados a diversas dosis.

En ensayos preliminares el Thiocur no se mostró suficientemente activo frente al crecimiento de colonias de P. tracheiphila como para que consiguiera ser utilizado este hongo en los bioensayos de sistemicidad, que permitieran el estudio de la distribución de estos productos en la planta, así como de su acúmulo, rapidez de absorción y persistencia. Este mismo hecho ocurrió en el caso de la Triforina, que no fue capaz de inhibir totalmente el desarrollo del hongo ni a concentraciones de 100 µg/ml.

Debido a esta falta de sensibilidad del patógeno por el Thiocur y especialmente por la Triforina, se ensayaron otros hongos con el fin de determinar su sensibilidad a estos productos.

En todos los ensayos las concentraciones de Benomyl y de Triforina, fueron referidas a sus respectivos principios activos, a excepción del Thiocur que como anteriormente se ha citado no conocíamos su composición.

Se empleó como sustrato agar-patata-dextrosa (PDA) a pH 5,6 - 5,9, en placas de Petri de 90 mm. de diámetro, a razón de 15 ml. por placa. Para el crecimiento de las colonias, las placas

fueron mantenidas en termostato a 22°C. y en la oscuridad.

Se realizaron 3 tipos de ensayos:

2.1.1. Aplicando el fungicida directamente sobre la superficie del sustrato .- En placas con PDA sembradas por nebulización con una suspensión del hongo, se colocaban simétricamente 3 círculos de papel de filtro de 7 mm. de diámetro, que eran humedecidos a continuación con 50  $\mu$ l de solución de producto, incorporado mediante una micropipeta de esta medida.

La suspensión del hongo se realizaba filtrando a través de 4 pliegues de gasa una suspensión de micelio del hongo, que había crecido en tubo inclinado con sustrato de PDA. La suspensión se realizaba en agua estéril.

Los hongos utilizados fueron: Penicillium expansum, Phoma tracheiphila, y Alternaria tenuis.

Las concentraciones de fungicidas usadas fueron: 10-25-50-100-200-500-1000-2000  $\mu$ g/ml.

Las medidas de posibles aros de inhibición formados en torno a los círculos de papel se efectuaban cada 48 h. y eran relacionados con la cantidad de producto contenida en las 50  $\mu$ l de solución, deduciéndose así la actividad inhibidora de los fungicidas a cada concentración y hongo ensayado.

Resultados:

- El Benomyl inhibió el crecimiento de las colonias de P. tracheiphila y P. expansum, a todas las concentraciones.
- El Thiocur presentó actividad de 200 µg/ml. en adelante, inhibiendo especialmente el crecimiento de colonias de P. expansum.
- La Triforina no fué activa frente al crecimiento de las colonias de los hongos ensayados.
- El orden decreciente de la actividad de los fungicidas frente al crecimiento de los hongos, fué: Benomyl, Thiocur y Triforina.
- A. tenuis no presentó sensibilidad a ningún producto, siendo descartada.

2.1.2. Aplicando el fungicida en el interior del sustrato por inyección. - En esta prueba la técnica consistía en colocar simétricamente sobre el sustrato de las placas, dos discos de colonias de 7 mm. de diámetro de igual peso y edad (8 días), procedentes del margen de la colonia originaria.

Los hongos ensayados fueron: Monilia cinerea, P. expansum y P. tracheiphila.

Las concentraciones de productos utilizadas fueron: 0 - 0,1 - 1 - 10 µg/ml., que se incluyeron en el sustrato en el momento de vertir en placas, estabilizando previamente las temperaturas de

los matraces contenedores de las respectivas dosis de substratos - calculadas para cada producto, a 50 °C. al baño María, para evitar la degradación del fungicida.

Se realizaron tres placas por concentración y hongo así como tres placas para los controles.

Las medidas de los diámetros de crecimiento de las colonias se efectuaron al cabo de 7 y 14 días.

El porcentaje de inhibición de crecimiento de las colonias a cada concentración, se determinaba comparando su crecimiento con el de las respectivas colonias crecidas a 0 µgr/ml, considerando el diámetro de la placa como el de un crecimiento del 100%.

#### Resultados:

- El Benomyl mostró actividad inhibidora frente al crecimiento de las colonias de los tres hongos.

- El Thiocur mostró particular acción inhibidora frente al crecimiento de colonias de P. expansum de 10 µgr/ml. en adelante

- La Triforina mostró una débil actividad de inhibición frente al crecimiento de las colonias de los tres hongos.

- El orden decreciente de la actividad de los fungicidas frente al crecimiento de los hongos fué: Benomyl, Thiocur y Triforina.

- M. cinerea no presentó prácticamente sensibilidad frente a la Triforina y similarmente frente al Thiocur, siendo des-

cartada.

2.1.3. Aplicando el fungicida incluido en el substrato. - Este tipo de ensayo consistía en efectuar dos perforaciones simétricas en el substrato de las placas mediante un dispositivo cilíndrico, previa siembra de las mismas con una suspensión del hongo (obtenida como en el ensayo 2.1.1.) por nebulización.

En las hoquedades realizadas en el substrato se depositaba la suspensión de producto mediante una micro-pipeta de 50  $\mu$ l

Los hongos utilizados fueron: P. expansum frente al Benomyl y Thiocur, y Cladosporium cucumerinum frente a Benomyl y Triforina.

Las concentraciones de producto utilizadas fueron: 250 - 500 - 1.000 - 2.000  $\mu$ gr/ml.

La medida del radio de los posibles aros de inhibición presentes en torno a las hoquedades del substrato en que se había depositado el producto, relacionada con los 50  $\mu$ l de producto depositada en las mismas, determinaba la actividad del fungicida frente al crecimiento de las colonias.

Resultados ( Diagrama 1 ; Tabla 1 ) .

- Frente al crecimiento de colonias de P. expansum, presentó mayor actividad inhibidora el Benomyl que el Thiocur
- La Triforina mostró una efectiva actividad de inhibi-

DIAGRAMA 1 HALOS DE INHIBICION DE *PENICILLIUM EXPANSUM* Y *CLADOSPORIUM CUCUMERINUM*  
EN FUNCION DE LA RESPECTIVA CONCENTRACION DE BENONYL THIOCUR Y TRIFORINE

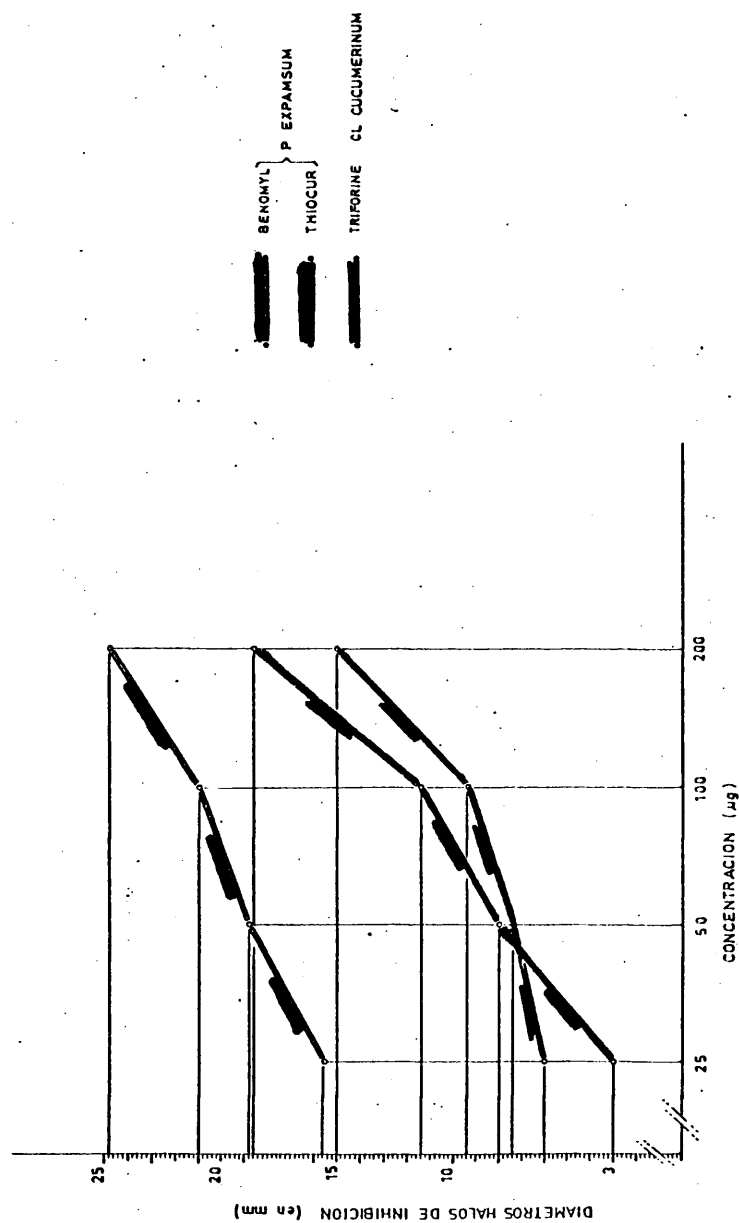


TABLA 1.- Medida (mm.) de los alos de inhibición de Penicillium expansum y Cladosporium cucumerinum correspondientes a las diversas cantidades de fungicidas depositadas en cada hoquedad realizada en el substrato.

Cantidad de fungicida (µgr)	Benomyl (a)	Triforina (b)	Thiocur (a)
25	15,5	6	3
50	19	7,4	8
100	21	9	11,4
200	24	15	18,8

(a) Benomyl  
Thiocur

Solamente se estudiaron sus acciones frente al P. expansum

(b) Triforina Solamente se estudió su actividad frente al Cl. cucumerinum



ción frente al Cl. cucumerinum .

- En general el orden decreciente de actividad de los productos frente al crecimiento de las colonias fué : Benomyl, Thiocur, y Triforina.

-----

Asi pues estos tres tipos de ensayos permitieron observar que en línea general, el orden decreciente de actividad inhibidora de los productos frente al crecimiento de las colonias de hongos ensayados fue: Benomyl, Thiocur y Triforina, asi como seleccionar al P. expansum por su sensibilidad al Benomyl y Thiocur, y al Cl. cucumerinum a la Triforina, para ser ensayados en los posteriores bioensayos de sistemicidad de los fungicidas en estudio

## 2.2 Pruebas en cámara climática.-

Consistían en aplicar diversas concentraciones de los productos a plantones de naranjo amargo (C. aurantium L.) mantenidos en cámara climática a temperatura de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ., con objeto de observar:

2.2.1.- Posible fitotoxicidad en relación a las diferentes concentraciones aplicadas de los productos.

2.2.2.- Sistemicidad de los productos, es decir: su distribución en la planta, así como su rapidez de absorción, acumulo, y persistencia en la planta.

2.2.3.- Actividad de los productos en el control de la enfermedad en plantones infectados con P. tracheiphila.

Los plantones utilizados eran de 18 meses de edad y estaban dispuestos en contenedores de una capacidad de un litro, en un kilogramo de una mezcla del 70% de tierra y 30% de turba. Estos plantones se llevaron a una cámara climática unos 15 días antes de iniciarse las pruebas, con el fin de estabilizarlos en las condiciones ambientales de dicha cámara en que serían realizadas las pruebas.

Los dos tipos de tratamiento utilizados fueron: foliar

y al terreno.

En el tratamiento foliar se nebulizaban las hojas con la suspensión de producto en agua estéril, hasta que quedaban bañadas, evitando que el líquido llegase a gotear; se usaron aproximadamente 10 cc. por plantón. Para que el producto no penetrase en el terreno y falseara los resultados del ensayo al ser absorbido por la raíz, se cubría la superficie de terreno en torno al tallo con papel de filtro.

En el tratamiento al terreno, las concentraciones utilizadas eran referidas al peso de terreno seco por cada plantón (aproximadamente 1 kilo), usándose 40 cc. de suspensión de producto por cada uno de ellos.

A los plantones utilizados como testigos se aplicaba agua estéril, en igual cantidad de suspensión usada para los correspondientes plantones tratados

Se considera como perteneciente a una misma experiencia en cada prueba, el grupo de plantones a quienes se aplica el mismo producto, concentración, etc...

**2.2.1. - Ensayos para la identificación de posibles síntomas de fitotoxicidad.** Los productos se suministraron en suspensión acuosa y a diferentes concentraciones, efectuándose dos tipos de tratamientos, foliar y al terreno.

En el tratamiento foliar se usaron los productos a las concentraciones de 1.000 y 2000 ppm. utilizándose 18 plantones.

En el tratamiento al terreno, las concentraciones suministradas fueron de 200 y 500 ppm., utilizándose otros 18 plantones.

Para ambos tipos de tratamientos se utilizaron como testigos 3 plantones.

La observación de los plantones para la detección de síntomas de fitotoxicidad se realizó semanalmente, estando referida a la parte aérea de la planta.

Los síntomas consistían en la apreciación en las hojas, de clorosis, enrollamientos, encartuchamientos, necrosis en sus márgenes y caída de las mismas, especialmente a las concentraciones mayores.

Para la medida de tales síntomas, se utilizó la siguiente escala empírica de valoración, que va de la clase 0 a la 3:

- 0 - ningún síntoma
- 1 - hojas apicales ligeramente rizadas
- 2 - hojas apicales o basales encartuchadas y con necrosis en los márgenes
- 3 - caída de las hojas con necrosis

Como resultado se observó que solamente la Triforina fué fitotóxica, en las dos concentraciones suministradas al terreno

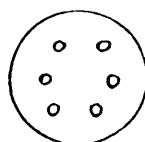
de 200 y 500 ppm. La fotografía (8) y (9) corresponden a plantones afectados. La Fot. (8), muestra un plantón con síntomas de la clase 2 de la escala, ocasionados por la Triforina aplicada a dosis de 200 ppm.; la Fot. (9) muestra síntomas de grado de la clase 3, causados por la Triforina aplicada a concentración de 500 ppm.

#### 2.2.2.- Ensayos de sistemicidad de los productos

Tenían por finalidad averiguar el comportamiento de los fungicidas en el interior de la planta.

En los bioensayos se utilizó la técnica descrita por ERWIN et al. (1.968). El material a ensayar provenía de la raíz, tallo y hojas de los plantones y estaba constituido de discos de hoja de 7mm. de diámetro, secciones de cilindro leñoso y sus correspondientes anillos de corteza de unos 3mm. de longitud. Este material se cortaba a dos alturas del tallo, correspondientes a 10 y 20 cm. por encima del cuello de la planta. Asimismo, de la raíz se cortaban 3 secciones de leño y sus correspondientes anillos de corteza también de 3 mm. de longitud como los procedentes del tallo.

Las placas Petri utilizadas eran de 9 cm. de diámetro y contenían agar-patata-dextrosa (PDA) como medio de cultivo siendo sembradas uniformemente por nebulización con una suspensión de hongos, sobre cuya superficie eran colocadas las porciones de órganos de los plantones simétricamente, según el esquema,





Fot.8 .- Plantón de naranjo amargo de 18 meses de edad mostrando síntomas de fitotoxicidad de grado de la clase 2 de la Escala de valoración, causados por la Triforina aplicada al terreno a concentración de 200 ppm.



Fot.9 .- Plantón de naranjo amargo de 18 meses de edad mostrando síntomas de fitotoxicidad de grado de la clase 3 de la Escala de valoración, causados por la Triflorina aplicada al terreno a concentración de 500 ppm.

Para cada plantón se usaron 4 placas Petri, 3 para el material procedente de su parte aérea, y 1 para el proveniente de la raíz. En cada placa se colocaron 6 trozos, siendo de igual naturaleza los pertenecientes a la parte aérea, colocando 3 porciones de hoja con 3 porciones, 3 anillos de corteza con otros 3, etc..., correspondiendo cada 3 porciones de órgano a cada una de las 2 alturas consideradas en la planta. Por el contrario, en el caso de la raíz se disponían 3 porciones de leño con 3 de corteza.

Las plantas eran incubadas en termostato a 22°C. durante 48 horas, al cabo de este tiempo eran medidos los eventuales alos de inhibición.

La medida de los alos de inhibición dependía de la cantidad de producto existente en la porción de órgano correspondiente de los plantones, así como de la actividad del fungicida sobre el hongo ensayado. Así pues, la medida media de los alos relativos a cada órgano obtenida al final de cada bioensayo, venía a determinar, por una parte el comportamiento sistémico del producto en los distintos órganos de la planta a cada concentración, es decir, se obtenía en cada intervalo de tiempo en que eran efectuados los bioensayos el acúmulo, rapidez de absorción y persistencia del fungicida. De igual forma, si la media se obtenía a partir de los alos presentados por los 4 órganos para cada concentración, se conseguía una idea global de la distribución del producto en la planta.



Las colonias utilizadas para sembrar las placas fueron de P. expansum para las que contenían porciones de órganos provenientes de plantones tratados con Benomyl y Thiocur y Cl. cucumerinum para las placas que contenían material procedente de plantones tratados con Triforina, ya que en los ensayos "in vitro" fueron seleccionados estos hongos en orden a su sensibilidad a estos productos.

En cada bioensayo se utilizaron porciones de órganos provenientes de 2 plantones por concentración y producto, así como de 2 testigos.

Estas pruebas se verificaban a diversos intervalos de tiempo, después del tratamiento de los plantones.

La aplicación de los productos a los plantones en las 3 pruebas de sistemicidad que se realizaron, fué en suspensión acuosa o en suspensión acuosa con la adición de aceites minerales blancos de diversa viscosidad.

Los ensayos de sistemicidad se han realizado paralelamente a las pruebas de control de la enfermedad, de forma correlativa, en cuanto al uso o no de aceites en los tratamientos, para que el comportamiento sistémico de los productos en la planta pudiera ser relacionado en cada caso con la efectividad de los mismos en el control del desarrollo de los síntomas.

Asimismo, la aplicación de los aceites en experiencias de sistemicidad y control, se debe a los positivos resultados obtenidos en pruebas análogas por SOLEL et al. (1.972), ZAKI y ERWIN (1.973), WICKS (1.973), ERWIN et al. (1.974) y DE CICCIO y LUISI (1.975).

2.2.2.1. Primera prueba de sistemicidad. Los productos se aplicaron en suspensión acuosa, efectuándose dos tipos de tratamiento, foliar y al terreno.

Las concentraciones empleadas fueron, en el tratamiento foliar de 1.000 ppm. y en el tratamiento al terreno de 200 y 500 ppm.

Se utilizaron 78 plantones, 36 para el tratamiento foliar y otras 36 en el tratamiento al terreno, destinándose 18 plantones para cada concentración. Como testigos para ambas pruebas se utilizaron 6 plantones.

Se efectuaron 3 bioensayos a los 10, 20 y 30 días del tratamiento.

Resultados:

Tratamiento foliar. Mostró mayor sistemicidad la Triforina, particularmente por su acúmulo en hoja y raíz, rapidez de absorción en hoja durante los 13 ó 14 primeros días, y por su persistencia en raíz, por depositarse en ella el producto proveniente de los

otros órganos de la planta. En segundo lugar, fué más sistémico el Benomyl, particularmente por su persistencia en raíz. El Thiocur se mostró poco sistémico en esta modalidad de tratamiento.

Tratamiento al terreno. Destacó la sistemicidad del Thiocur, especialmente por su acúmulo y rapidez de absorción en raíz y leño, durante los 20 días consecutivos al tratamiento, e incluso por mostrar buena persistencia en hoja. En segundo lugar, presentó buena sistemicidad el Benomyl, particularmente por su acúmulo en leño y raíz, rapidez de absorción en leño, así como por su buena persistencia en hoja y raíz. La Triforina se mostró poco sistémica, si bien presentó cierto acúmulo en raíz pero de absorción lenta, y cierta persistencia en hoja y raíz.

A los plantones utilizados en esta primera prueba, de carácter mas bien preliminar, se les efectuó un control de fitotoxidad al cabo de la primera semana, obteniéndose resultados que coincidían con los de la prueba de fitotoxidad, es decir, la Triforina se manifestó fitotóxica a las dos concentraciones aplicadas al terreno de 200 y 500 ppm.

2.2.2.2. Segunda prueba de sistemicidad. Como en la primera prueba, los productos se aplicaron en suspensión acuosa, efectuándose dos tipos de tratamiento, foliar y al terreno.

Las concentraciones empleadas fueron, en el tratamiento

foliar de 1.000 ppm, y en el tratamiento al terreno se aplicó solamente la de 200 ppm, por la eficacia que mostró en la 1ª Prueba

Para cada modalidad de tratamiento se usaron 36 plantones. Como testigos para ambos tipos de tratamiento se utilizaron 12 plantones.

Los bioensayos se realizaron a 5, 15, 25, 35, 45 y 65 días del tratamiento.

Resultados, (Tabla 2 a y b ; Diagramas 2 a, b y c):

Tratamiento foliar. En términos generales el orden de mayor a menor sistemicidad de los productos fué, Triforina, Benomyl y Thiocur. La Triforina destacó por su acúmulo y rapidez de absorción, y en segundo lugar por su persistencia. Presentó el mayor acúmulo de los tres productos, que se manifestó en hoja a 15 días de tratamiento y en raíz a 25 días, por tanto la planta tenía entre 10 y 30 días las mayores cantidades de Triforina. Mostró la mayor rapidez de absorción en hoja entre 5 y 15 días, y en raíz entre 15 y 25 días aproximadamente del tratamiento. Asimismo presentó buena persistencia en raíz (si bien menor que el Benomyl), hasta más de 65 días, por darse en ella un acúmulo creciente de producto de los 45 días en adelante, proveniente de los otros órganos de la planta.

El Benomyl presentó el mayor acúmulo en raíz, de 45 días en adelante y en segundo lugar en hoja, donde presentó cierto

TABLA 2 (a). - Sistemicidad del Benomyl, Triforina y Thiocur en tratamiento foliar a concentración de 1.000 ppm.

Productos	Porciones de órganos de plantones	Medida (mm.) de los alos de inhibición al cabo de los días, (1):					
		5	15	25	35	45	65
Benomyl	hoja	2,30	3,00	1,00	0,00	0,00	0,00
	corteza	0,80	1,20	3,10	1,10	0,00	0,00
	leño	1,00	0,70	0,50	0,30	0,00	0,00
	raiz	0,00	0,50	0,80	1,60	3,90	4,10
Triforina	hoja	0,83	8,00	1,00	0,16	0,00	0,60
	corteza	2,60	2,00	1,50	1,10	0,66	0,83
	leño	0,80	2,60	2,75	0,75	0,75	0,41
	raiz	2,00	3,00	6,40	1,80	1,10	3,50
Thiocur	hoja	3,00	2,00	1,00	0,80	0,00	0,00
	corteza	1,00	0,80	0,90	0,70	0,00	0,00
	Leño	0,00	0,00	0,30	0,20	0,00	0,00
	raiz	1,00	0,00	0,70	1,50	0,00	0,50

(1). - Cada dato constituye la media de 12 medidas correspondientes al radio del alo de inhibición pre-  
sentado en torno a cada porción del órgano ensayado, relativo a dos alturas del tallo de dos --  
plantones y a una longitud de raiz.

TABLA 2 (b).- Sistemicidad del Benomyl, Triforina y Thiocur, en tratamiento al terreno a concentración de 200 ppm.

Productos	Porciones de órganos de plantones	Medida (mm) de los alos de inhibición al cabo de los días, (1):					
		5	15	25	35	45	65
Benomyl	hoja	0,00	5,80	7,10	6,70	5,00	5,10
	corteza	0,80	8,40	7,50	0,60	0,90	0,20
	leño	5,30	12,80	6,00	1,50	0,50	0,40
	raiz	6,20	4,90	9,70	3,10	5,20	1,50
Triforina	hoja	0,00	1,75	1,25	0,16	2,90	0,10
	corteza	0,00	2,90	2,00	1,33	1,08	0,00
	leño	0,00	1,50	2,58	0,75	0,08	0,00
	raiz	0,00	1,00	5,16	2,80	2,66	1,00
Thiocur	hoja	2,00	4,70	11,50	12,00	6,50	4,00
	corteza	3,00	13,00	12,30	5,10	4,30	0,20
	leño	4,30	14,70	14,80	11,50	5,80	0,90
	raiz	0,00	15,00	18,30	11,50	5,60	0,60

(1).- Cada dato constituye la media de 12 medidas correspondientes al radio del alo de inhibición presentado en torno a cada porción del órgano ensayado, relativo a dos alturas del tallo de dos -- plantones y a una longitud de raíz.

DIAGRAMA 113. RELATIVO AL ACUMULO Y PERSISTENCIA DEL BENOMYL EN HOJA, CORTEZA, LENO Y RAZ  
DE PLANTONES DE MAMAO AMARCO TRAZADOS A LA HOJA A CONCENTRACION DE 1000 PPM Y AL TERRENO  
A CONCENTRACION DE 200 PPM AL CABO DE LOS 1-15-25-35-45 Y 65 DIAS DEL TRATAMIENTO

TRATAMIENTO

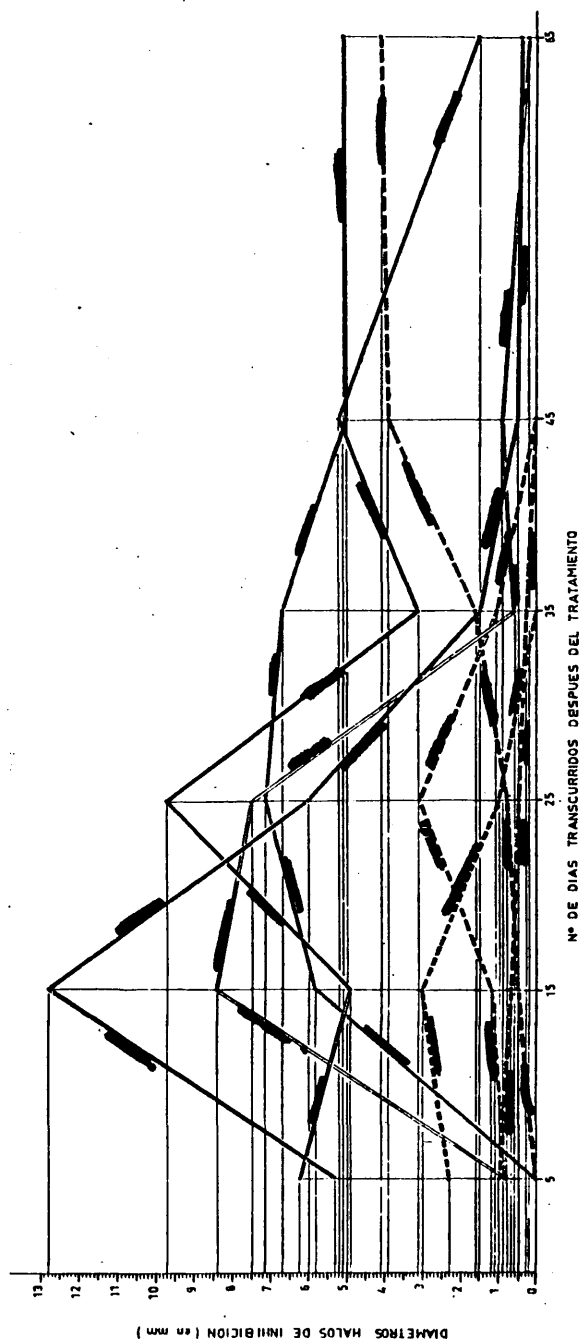


DIAGRAMA II. RELATIVO AL ACUMULO Y PERSISTENCIA DE LA TRIFORINA EN HOJA, CORTEZA, LEÑO Y RAIZ DE PLANTONES DE NARANJO AMARGO TRATADOS A LA HOJA A CONCENTRACION DE 1800 PPM Y AL TERRENO A CONCENTRACION DE 300 PPM AL CABO DE LOS 5 15 25 35 45 65 DIAS DEL TRATAMIENTO.  
ORGANISMO ENSAYADO: CL. CUCURBITULUM.

TRATAMIENTO

	HOJA	POLIAR	TERRENO
■	■	■	■
■	■	■	■
■	■	■	■
■	■	■	■
■	■	■	■
■	■	■	■
■	■	■	■
■	■	■	■
■	■	■	■
■	■	■	■

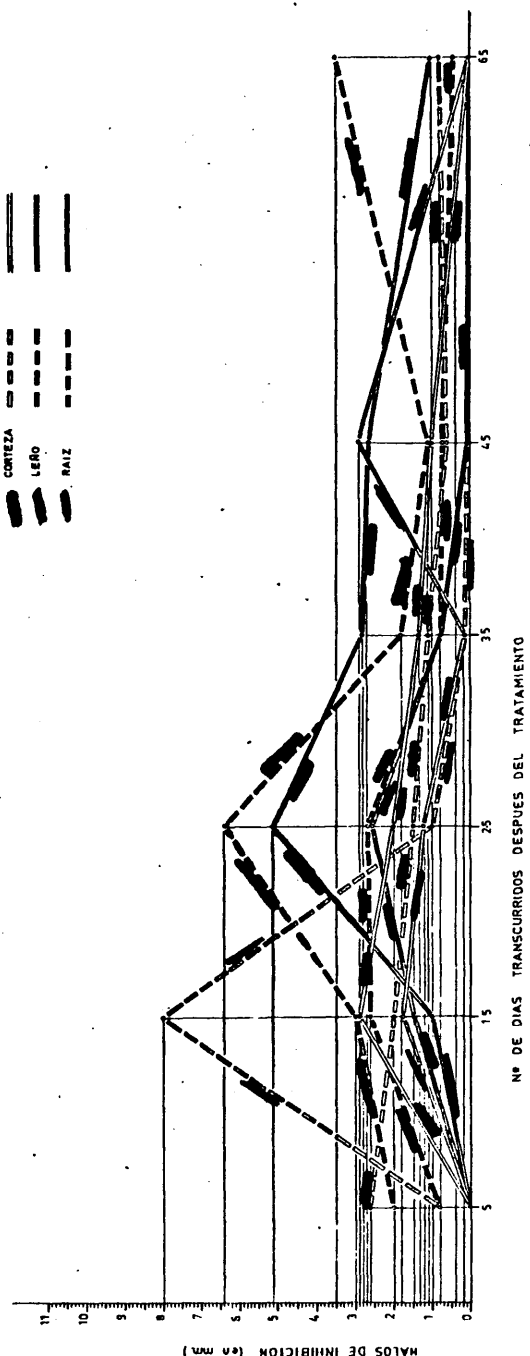
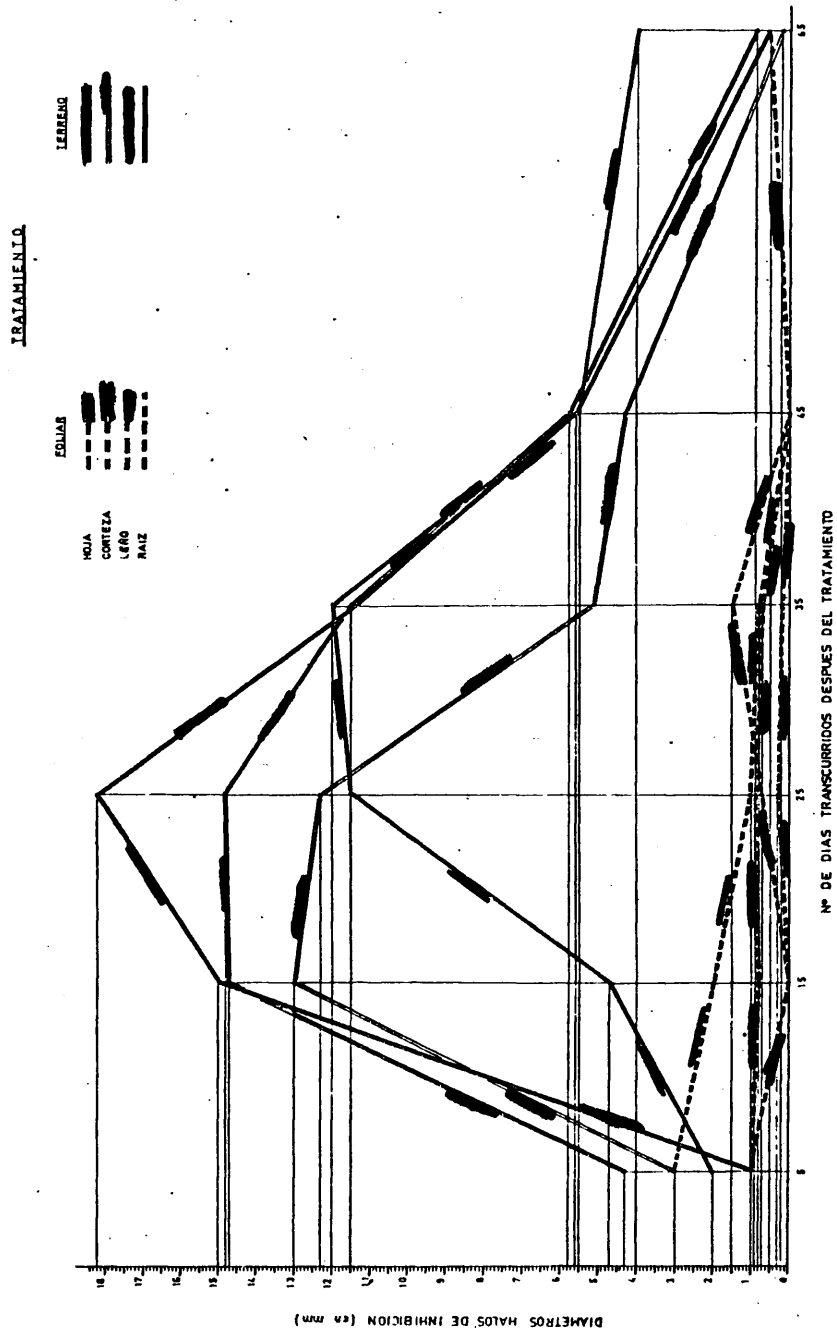




DIAGRAMA II. RELATIVO AL ACUMULO Y PERSISTENCIA DEL THIOUR EN HOJA, CORTEZA, LEÑO Y RAIZ DE PLANTONES DE MARIANO AMARILLO, TRATADOS A LA HOJA A CONCENTRACION DE 1000 PPM. Y AL TIEMPO A CONCENTRACION DE 200 PPM, AL CARGO DE LOS 5-15-25-35-45 Y 55 DIAS DEL TRATAMIENTO. ORGANISMO ENSAYADO: *PERICILLIUM STREPTOSUM*.



acúmulo inicial con el máximo a 15 días y en corteza a 25 días. Mostró cierta rapidez de absorción en hoja. La persistencia fué su característica especial en este tipo de tratamiento, por presentar una apreciable cantidad de producto en raíz que se estabilizó a 45 días, prosiguiendo hasta pasados los 65 días del tratamiento, -- siendo el más persistente de los tres productos ensayados.

El Thiocur se mostró poco sistémico en tratamiento foliar, presentando solamente cierto acúmulo en hoja a 5 días del tratamiento que consecutivamente fué decreciendo; por tanto, solo -- mostró cierta rapidez de absorción inicial.

Tratamiento al terreno. En términos generales el orden de mayor a menor sistemicidad de los productos fué: Thiocur, Benomyl y Triforina, destacando el Thiocur.

El Thiocur presentó el mayor acúmulo, rapidez de absorción y persistencia de los tres productos. Sus mayores acúmulos se dieron en raíz, con un máximo a 25 días del tratamiento, y en leño entre 15 y 25 días después. No obstante, en corteza y hoja, se acumularon asimismo cantidades apreciables de producto, en hoja entre 15 y 25 días después del tratamiento y en corteza entre 25 y 35. De igual forma manifestó una gran rapidez de absorción, si bien el producto apareció acumulado más tarde en hoja, debido al sentido de transporte del fungicida en el interior de la planta en este tipo de tratamiento. Presentó buena persistencia, en hoja especialmente,

estando este hecho también relacionado con el sentido de circulación del producto. El Benomyl presentó también buena sistemicidad en esta modalidad de tratamiento, si bien menor que el Thiocur; sus mayores acúmulos se dieron en leño a los 15 días del tratamiento y en raíz a los 25 días mostró una absorción bastante rápida, pasando con prontitud al leño, donde se observó el mayor acúmulo, que se manifestó a 15 días del tratamiento. Manifestó buena persistencia hasta más de 65 días tras el tratamiento, particularmente en hoja y en segundo lugar en raíz.

La Triforina se mostró poco sistémica en tratamiento al terreno con gran diferencia de los otros productos. Presentó un cierto acúmulo en raíz con un máximo a 25 días del tratamiento. Su absorción fue lenta. Presentó poca persistencia, observándose cierta cantidad en raíz que persistió hasta pasados 65 días, y en menor cantidad en hoja que persistió hasta los 60 días del tratamiento.

2.2.2.3 Tercera prueba de sistemicidad. Los productos se aplicaron en tratamiento foliar, en suspensión acuosa o en suspensión acuosa con la adición al 1 % de dos aceites minerales blancos de diversa viscosidad, respectivamente 20<sup>º</sup> y 268<sup>º</sup> Engler, que fueron aplicados separadamente. Por tanto se utilizaron tres modalidades de tratamiento.

La concentración utilizada fué de 1.000 ppm.

En estos ensayos se utilizaron 144 plantones. Cada grupo de 12 plantones constituyó una experiencia a la que se aplicó cada producto de cada una de las tres formas indicadas.

Como testigos se utilizaron 3 grupos de 12 plantones por cada tipo de vehículo ; es decir, solución acuosa en blanco, solución acuosa con la adición de aceite de 20 ° E., en blanco, y solución acuosa con la adición de aceite de 268 ° E. en blanco, obteniéndose un total de 36 plantones. Por tanto cada grupo de plantones recibió respectivamente la cantidad de agua estéril aplicada al grupo de plantones tratados con el producto sin adición de aceite o el volumen de emulsión acuosa con uno u otro aceite.

#### Resultados (Tabla 3, Diagramas 3)

El Benomyl fué mas sistémico, cuando se aplicó con aceite de 20 °E., que le confirió especialmente persistencia hasta pasados 65 días del tratamiento y con el que presentó buena rapidez de absorción que se manifestó particularmente entre 10 y 15 días, mostrando el mayor acúmulo a 15 días del tratamiento. El aceite de 268° E. le confirió cierta persistencia. En solución acuosa mostró una rapidez de absorción media, presentando cierto acúmulo a 10 días del tratamiento.

La Triforina fué mas sistémica en suspensión acuosa, y especialmente por su acúmulo y rapidez de absorción entre 10 y

TABLA 3.- Acúmulo y persistencia del Benomyl, Triforina y Thiocur, en hoja, corteza, leño y raíz de plántones de naranjo amargo de 18 meses de edad, en tratamiento foliar a dosis de 1.000 ppm, en agua o en emulsión al 1% de aceites minerales blancos de diversa viscosidad (20° E y 268° E)

Productos	Aceites		Porciones de órganos de plántones	Medida (mm) de los alos de inhibición al cabo de los días (1):					
	Conc. (%)	Visco (°E)		10	15	20	35	45	65
Benomyl	0	0	hoja	1,08	2,40	1,00	0,50	0,20	0,08
			corteza	2,00	1,25	0,16	1,16	0,80	0,66
			leño	1,90	1,00	1,00	0,80	0,40	0,08
			raíz	2,50	1,08	1,33	1,00	0,50	0,33
	1	20	hoja	1,50	7,00	3,00	2,30	2,00	1,12
			corteza	1,90	1,50	1,60	2,25	1,30	0,70
			leño	1,40	2,50	0,30	0,08	0,00	0,50
			raíz	0,58	3,25	0,30	0,75	0,75	1,04
	1	268	hoja	0,00	0,33	0,05	1,25	0,66	0,00
			corteza	0,30	1,50	1,75	0,75	0,66	0,33
			leño	0,41	1,50	0,16	0,33	0,33	0,40
			raíz	1,42	2,10	1,16	0,60	1,16	1,30
Triforina	0	0	hoja	0,83	8,00	1,00	0,16	0,00	0,00
			corteza	2,58	2,00	1,50	1,08	0,66	0,83
			leño	0,80	2,60	2,75	0,75	0,75	0,41
			raíz	2,00	3,00	6,40	1,75	1,08	1,16
	1	20	hoja	0,83	1,16	0,30	0,00	0,00	0,00
			corteza	4,40	3,70	2,10	0,50	0,33	0,91
			leño	3,60	2,08	1,30	0,40	0,66	0,41
			raíz	1,80	3,16	3,60	1,08	1,16	1,00
	1	268	hoja	0,75	1,33	0,25	0,00	0,00	0,00
			corteza	2,30	0,40	6,60	1,00	0,90	1,00
			leño	3,40	3,80	1,10	0,90	0,30	0,30
			raíz	3,50	0,80	4,16	2,08	1,75	1,16
Thiocur	0	0	hoja	0,00	0,58	0,25	0,00	0,00	0,00
			corteza	1,00	3,60	0,15	0,50	0,50	0,10
			leño	1,66	1,60	0,40	0,16	0,00	0,56
			raíz	1,00	6,30	1,00	1,60	0,80	0,00
	1	20	hoja	0,50	0,90	0,83	0,08	0,06	0,40
			corteza	0,25	0,80	2,33	0,00	0,16	0,90
			leño	1,40	2,10	0,83	0,00	0,00	0,30
			raíz	1,58	2,50	6,50	2,00	1,25	1,46
	1	268	hoja	0,00	0,30	0,25	0,50	0,66	0,16
			corteza	0,90	2,30	7,00	0,41	1,16	0,75
			leño	1,60	1,66	0,83	0,66	0,00	0,75
			raíz	3,08	5,75	3,40	1,25	0,58	0,50

(1). - Cada dato es la media de 12 medidas, correspondientes al radio de los alos de inhibición presentes en torno a cada porción de órgano ensayado provenientes de cada una de las dos alturas de tallo y a una longitud de raíz, de 2 plántones que han recibido igual tratamiento.

GRÁFICA III. RELATIVO AL ACUMULO Y PERSISTENCIA DEL BENOMYL, TRIPORINA Y THIOUR EN PLANTONES DE NARANJO AMARGO POR TRATAMIENTO POLAR A DOSIS DE 1000 PPM EN SUSPENSIÓN ACUOSA O EN EMULSIÓN AL 1% DE ACEITES BLANCOS DE DIVERSA VISCOSIDAD MPE Y NMP.

SIN ACEITE  
NMP  
CON ACEITE  
NMP



Nº DE DÍAS TRANSCURRIDOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

15 días, mostrando el mayor acúmulo a 15 días del tratamiento. Asimismo en suspensión acuosa presentó cierta persistencia hasta pasados 65 días del tratamiento. Con los aceites fué mucho menos sistémica; no obstante, con el de 20ºE. presentó rapidez de absorción entre 10 y 15 días, mostrando cierta persistencia con ambos aceites, similar a la que manifestó en suspensión acuosa.

El Thiocur fué mas sistémico con los aceites que le confirieron buen acúmulo, destacando su rapidez de absorción con el de 268ºE, entre 15 y 20 días. Con el de 20ºE presentó una absorción lenta, mostrando el mayor acúmulo a 35 días del tratamiento con buena persistencia. En solución acuosa fué poco sistémico, si bien presentó cierta rapidez de absorción y el mayor acúmulo a 15 días, no obstante se acumuló poco y no presentó prácticamente persistencia

-----

Para construir el Diagrama 3 se ha considerado la media de cada 4 datos de la Tabla 3, correspondientes a los plantones tratados con cada producto y modalidad de aplicación.

2.2.3. Ensayos de control de los productos en el desarrollo de la enfermedad. Para determinar la actividad de control de los fungicidas se realizaron dos pruebas en cámara climática

En la primera prueba se trataron los plántones con los productos en suspensión acuosa y en la segunda prueba, fueron suministrados de dos formas: en suspensión acuosa y en suspensión acuosa con la adición de dos aceites minerales blancos de diversa viscosidad, separadamente. Los aceites utilizados fueron los mismos usados en la tercera prueba de sistemicidad, es decir, 20<sup>º</sup>E y 268<sup>º</sup>E.

En ambas pruebas se aplicaron los productos a diversas concentraciones y el inóculo del hongo se obtuvo según la técnica de SALERNO y CATARA (1.967), usando una cepa monoconídica de P. tracheiphila de elevado poder patógeno.

El cultivo del hongo para la producción de órganos de multiplicación que constituirían el inóculo, conidios de tipo hifal, se llevó a cabo en caldo de zanahoria mantenido en continua agitación durante 4 días a temperatura de 20<sup>º</sup>C. y a luz difusa, al cabo de los cuales se filtró el cultivo a través de 4 estratos de gasa, obteniéndose así una suspensión en el mismo tipo de cultivo de conidios de tipo hifal, midiéndose la concentración mediante un turbidímetro fotoeléctrico previamente tarado.

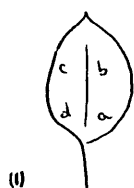


Los productos fueron aplicados a los plantones de dos formas, tratamiento foliar y al terreno, manteniéndose en su realización las características indicadas al respecto en los ensayos de sistemicidad.

Las medidas de valoración del desarrollo de los síntomas de la enfermedad se llevaron a cabo semanalmente, dándose mayor importancia a la 3ª y 4ª medida.

Los plantones tratados a la hoja, fueron inoculados por nebulización foliar, con una suspensión de conidios de tipo hifal a concentración de  $10^6$  / ml.

Para efectuar la inoculación foliar, se realizaron 4 punteaduras en la hoja en la disposición que indica el esquema (1),



obteniéndose así un total de 20 punteaduras, que al ser nebulizadas con el inóculo podrían desarrollar eventuales síntomas de infección.

(1) Las medidas del desarrollo de los síntomas se iniciaron con la aparición de éstos (unos 15 días después de la inoculación del patógeno). La escala empírica de valoración utilizada fué la debida a LUISI et al. (1.976):

Clase 0 : ninguna señal de infección

" 1 : ligero alo clorótico alrededor del punto de inoculación.

" 2 : ligera clorosis de la nerviación vecina al punto de infección, extendiéndose en dirección al margen foliar.

Clase 3 : la clorosis de la nerviación ha alcanzado el margen foliar y se ha extendido incluso lateralmente.

" 4 : oscurecimiento de la nerviación hasta la necrosis de la zona circundante al punto de infección.

" 5 : desecamiento o caída de la hoja infectada

En las pruebas relativas a tratamientos foliares, cada experiencia estaba constituida por 4 plantones ensayados a cada producto y concentración y con la adición o no de aceites auxiliares, siendo considerada en estas pruebas el número de puntos infectados por experiencia y la intensidad media de los síntomas que presentaban dichos puntos de infección.

En el caso de los plantones tratados al terreno, la inoculación se realizó al tallo por incisión del cilindro leñoso a unos 10 centímetros por encima del cuello del tallo. La incisión se realizó transversalmente mediante un cuchillo sobre cuya hoja, previamente esterilizada, eran colocadas algunas gotas de la suspensión del hongo, que a causa de las diferencias de presión entre el medio externo y el interior de los vasos leñosos eran rápidamente reabsorbidas por éstos, SALERNO y CATARA (1.967)

En este caso de tratamiento al terreno, en que la inoculación se realizaba al tallo por incisión, la enfermedad fué valorada utilizando la escala empírica propuesta por SCARAMUZZI et al. (1.964), iniciándose el desecamiento en la planta por las hojas

apicales:

Clase 0 : ningún síntoma de la enfermedad.

- " 1 : una o dos hojas apicales con decoloración en las nerviaciones.
- " 2 : hojas con síntomas (decoloración de las nerviaciones, clorosis mas o menos extensas o desecamiento de la lámina) o caída, en número no superior al 50 % del total.
- " 3 : hojas con síntomas (o caída) en número superior al 50 % del total.
- " 4 : todas o casi todas las hojas caídas o secas, con desecamiento de la planta, iniciándose por el ápice.

En las pruebas relativas a tratamiento al terreno, cada experiencia estaba constituida por 10 plántones, que fueron ensayados a cada producto y concentración. En la valoración de los síntomas desarrollados, se consideró la intensidad media de los valores de los síntomas referidos a los 10 plántones. Asimismo se obtuvo el porcentaje de plantas muertas por experiencia.

#### 2.2.3.1. - Primera prueba de control de la enfermedad

Los fungicidas fueron aplicados en suspensión acuosa usándose dos modalidades de tratamiento : foliar y al terreno. Se utilizaron 308 plántones en total.

El tratamiento foliar se utilizaron 84 plántones, a quienes se suministraron los productos a concentraciones de 250-500-1000 ppm y a diverso nº de días antes y después de la inoculación del patógeno: Dos grupos de 36 plántones fueron tratados respectiva-

mente 20 y 5 días antes de la inoculación , siendo tratados 12 plantones 10 días después de la inoculación del patógeno , recibiendo estos últimos , solamente la mayor concentración de producto de 1.000 ppm. Como control se usaron 4 plantones que recibieron solamente agua es téril en la cantidad suministrada a los plantones tratados en la suspen sión de producto .

En el tratamiento al terreno , se utilizaron 210 plantones , aplicándoseles los productos a concentraciones de 50 - 100 - 200 ppm. Los plantones se dividieron en diversos grupos , que recibieron la aplicación de producto en días diferentes respecto a la fecha de inoculación del patógeno.

Dos grupos de 90 plantones , fueron tratados respec tivamente 20 y 5 días antes de la inoculación del patógeno , y un gru po de 30 plantones recibió el tratamiento 10 días después de la inocu lación y a la mayor concentración de 200 ppm. Como control en este tipo de tratamiento al terreno , se usaron 10 plantones .

Las medidas de intensidad de desarrollo de los sínto mas , se efectuaron a 14 - 21 - 28 - 35 días después de la inoculación

Los resultados que se dan a continuación en la Tabla 4 a , b , han sido obtenidos mediante un tratamiento estadístico , uti lizando el método de " bloques randomizados" .

En la Tabla 4 a , correspondiente a tratamiento fo- liar , cada bloque estaba constituido por 4 plantones , inoculados por ne

bulización sobre 5 hojas cada uno , de forma que pudiera constituir cada hoja 4 posibles puntos de infección . Así pues , cada bloque estaba basado en 80 puntos de repetición (de posible infección).

En la Tabla 4 b , correspondiente a tratamiento al terreno , los resultados fueron obtenidos igualmente por tratamiento estadístico , utilizando asimismo , el método de "bloques randomizados" , estando cada bloque constituido por 10 plantones de repetición , que al ser inoculados al tronco por escisión del cilindro leñoso , podrían manifestar en las hojas posibles síntomas de infección .

Resultados (Tabla 4 a , b ) :

Para determinar la actividad de los productos en el control , se compararon los valores de los síntomas de la enfermedad desarrollados en los plantones tratados , con los presentados por los plantones utilizados como testigos .

Tratamiento foliar (Tabla 4 a ) Se obtuvo una mayor actividad de los productos , cuando estos se suministraron 5 días antes de la inoculación , que cuando se trataron 20 días antes . A 10 días después , los productos no fueron efectivos ni a la mayor concentración aplicada de 200 ppm , superando en general la intensidad de síntomas presentada por los plantones tratados a la mostrada por los usados como testigos .

TABLA 4 (a) - Actividad del Benomyl, Triforina y Thiocur contra el "mal secco" Han sido utilizados plantones de naranjo amargo de 18 meses de edad, tratados a la hoja antes y después de la inoculación del patógeno por nebulización foliar (1).

Fecha aplicación tratamiento	Fungicidas	Concentraciones (ppm)	Intensidad media de los síntomas al cabo de los días de inoculación:			Puntos infectados por la inoculación (%)
			28 días	35 días	(2)	
20 días antes de la inoculación	Benomyl	1000	0,23 A	0,57 A	ab	16
		500	0,27 A	0,58 A	ab	19
		250	0,83 A	1,05 A	ab	41
	Triforina	1000	0,70 A	1,06 A	ab	41
		500	0,77 A	1,08 A	ab	46
		250	1,83 B	2,97 B	c	72
5 días antes de la inoculación	Thiocur	1000	0,25 A	0,30 A	ab	16
		500	0,46 A	0,67 A	ab	39
		250	0,81 A	0,95 A	ab	40
	Benomyl	1000	0,08 A	0,12 A	ab	5
		500	0,10 A	0,12 A	ab	6
		250	0,27 A	0,42 A	ab	9
10 días después de la inoculación	Triforina	1000	0,68 A	1,10 A	ab	40
		500	0,73 A	1,16 A	b	44
		250	1,70 B	2,55 B	c	80
	Thiocur	1000	0,20 A	0,35 A	ab	12
		500	0,31 A	0,53 A	ab	19
		250	0,32 A	0,72 A	ab	20
10 días después de la inoculación	Benomyl	1000	2,47 BC	3,22 BC	c	94
		1000	3,06 C	4,21 C	d	96
		1000	2,97 C	4,20 C	d	98
	Testigos	--	2,55 BC	3,3 BC	c	96

(1) - Cada uno de los cuatro plantones de cada experiencia ha sido inoculado sobre 5 hojas, dando un total de 80 pug.

(2) - Sobre las columnas e letras iguales corresponden valores estadísticamente no significativos para una probabilidad. Las letras mayúsculas han sido utilizadas para  $P = 0,01$ , y las minúsculas para  $P = 0,05$

El orden de efectividad de los productos en sentido decreciente fué : Benomyl , Thiocur . La Triforina no fué prácticamente eficiente.

El Benomyl a concentración de 500 ppm. , mostró una eficacia similar a la que presentó a 1000 ppm. , ocurriendo algo similar con el Thiocur .

Tratamiento al terreno (Tabla 4 b). Los tratamientos aplicados 5 y 20 días antes de la inoculación del patógeno mostraron efectividad , ocurriendo lo contrario con los suministrados 10 días después , especialmente en el caso de la Triforina , ya que los plantones tratados con ella presentaron generalmente una intensidad de síntomas mayor que la manifestada por los testigos .

El orden de eficacia de los fungicidas en sentido decreciente fué , Thiocur , Benomyl .

El Thiocur presentó una efectividad de control del 100 % a las 3 concentraciones utilizadas , en las dos fechas de su aplicación antes de la inoculación, aplicado 10 días después de esta , su efectividad disminuyó , alcanzando los valores de los síntomas de los plantones tratados con el , aproximadamente el 50 % de los valores presentados por los plantones utilizados como testigos . El Benomyl mostró un control similar a 100 que a 200 ppm. , presentando buena actividad en la reducción de síntomas .

TABLA 4 (b). - Actividad del Benomyl, Triforina y Thiocur en el control del "mal secco". Se utilizaron plantones de naranjo emergiendo de 18 meses de edad, tratados al terreno e inoculados al tronco "por incisión" (1)

Fecha aplicación tratamiento			Intensidad media de los síntomas al cabo de los días de inoculación:						Plantas muertas 60 días tras inoculación (%)
Fungicidas	Concentraciones (ppm)		14 días		21 días		28 días		
			(2)	(3)	(2)	(3)	(2)	(3)	
20 días antes de la inoculación	Benomyl	200	0,1	A	0,3	A	0,4	A	0
		100	0,1	A	0,3	A	0,4	A	10
		50	1,1	B	1,7	B	2,4	B	50
5 días antes de la inoculación	Triforina	200	2,6	C	3,7	C	4,0	C	100
		100	2,6	C	3,8	C	4,0	C	100
		50	2,7	C	3,7	C	4,0	C	100
10 días después de la inoculación	Thiocur	200	0,0	A	0,0	A	0,0	A	0
		100	0,0	A	0,0	A	0,0	A	0
		50	0,0	A	0,4	AB	0,9	A	20
5 días antes de la inoculación	Benomyl	200	0,1	A	0,3	A	0,3	A	0
		100	0,3	AB	0,4	AB	0,4	A	0
		50	0,3	AB	0,4	A	0,5	A	0
10 días después de la inoculación	Triforina	200	2,6	C	3,6	C	3,9	C	90
		100	2,6	C	3,6	C	3,9	C	90
		50	2,6	C	3,8	C	3,9	C	90
10 días después de la inoculación	Thiocur	200	0,0	A	0,0	A	0,0	A	0
		100	0,0	A	0,0	A	0,0	A	0
		50	0,0	A	0,0	A	0,1	A	0
10 días después de la inoculación	Benomyl	200	0,3	AB	0,8	AB	0,8	A	0
		200	2,7	C	3,5	C	4,0	C	100
		200	1,2	B	1,5	B	1,8	B	0
Testigos	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		---	---	---	---	---	---	---	---

(1). - Las concentraciones fueron referidas al peso seco medio de terreno correspondiente a cada plantón (aproximadamente 1kg.).

(2). - Cada dato es la media de 10 lecturas efectuadas sobre 10 plantones componentes de cada experiencia.

(3). - Sobre las columnas, e letras iguales corresponden valores estadísticamente no significativos para una probabilidad. Las letras mayúsculas fueron utilizadas para  $P = 0,01$ , y las minúsculas para  $P = 0,05$ .



-----  
Relación de los resultados de estas pruebas de control con la sistemicidad de los productos aplicados de igual forma:  
-----

En el tratamiento foliar, la efectividad de control del Benomyl, se podría justificar en relación a su sistemicidad, especialmente por su buena persistencia, así como por su acúmulo medio y cierta rapidez de absorción. En este tipo de tratamiento, la Triforina no presenta concordancia entre su efectividad de control y comportamiento sistémico, ya que no controló prácticamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad y fué por el contrario el producto que mostró mejor sistemicidad. En relación al Thiocur, su eficacia media en tratamiento foliar en los ensayos de control, puede justificarse por su rapidez de absorción inicial media, ya que fué poco sistémico.

En el tratamiento al terreno, se observó un claro paralelismo entre la eficacia de los productos y su sistemicidad, que fué en orden decreciente: Thiocur, Benomyl, Triforina, ya que si el Benomyl resultó ser siempre más efectivo que el Thiocur, la mayor sistemicidad de éste compensó su actividad. En el caso de la Triforina su ineffectividad en el control, está justificada hasta un cierto punto con su sistemicidad, puesto que si bien mostró lentitud de absorción, presentó cierto acúmulo y persistencia.

2.2.3.2. Segunda prueba de control de la enfermedad. Los productos fueron aplicados por tratamiento foliar mediante nebulización, siendo comparada entre sí la actividad de control de dichos fungicidas de 2 formas: suministrados -- simplemente en suspensión acuosa o en suspensión acuosa con la adición al 1% de dos aceites minerales blancos, de 20º E. y 268 º E., respectivamente. Las concentraciones utilizadas fueron de 100 y 500 ppm en todo caso. Los tratamientos se realizaron únicamente 5 días antes de la inoculación del patógeno, por la efectividad que en la prueba anterior se observó para los productos aplicados en esta fecha, respecto a la de inoculación.

Se trataron un total de 80 plantones repartidos de la siguiente forma:

Para cada uno de los tres productos en suspensión - acuosa y aplicados a dos concentraciones, se utilizaron 4 plantones en cada caso, total 24 plantones.

Para cada uno de los tres productos en suspensión - acuosa, aplicados a las dos concentraciones con la adición de aceite de 20º E., se utilizaron 4 plantones por producto y concentración, en total 24 plantones.

Para cada uno de los tres productos en suspensión - acuosa aplicados a las dos concentraciones utilizadas y con la adición de aceite de 268 ºE., se utilizaron 4 plantones por producto y

concentración , total 24 plantones .

Como control se utilizaron 4 plantones por cada tipo de vehículo ; es decir , solución acuosa en blanco , solución acuosa con la adición de aceite de 20 ° E. en blanco , y solución acuosa con la adición de aceite de 268 ° E. en blanco , obteniéndose un total de 12 plantones

La técnica de inoculación y escala empírica de valoración de los síntomas fueron los mismos que se aplicaron en la prueba anterior en el caso del tratamiento foliar , e igualmente el tratamiento de las medidas.

La valoración del desarrollo de los síntomas de la enfermedad , se realizó al cabo de los siguientes días de la inoculación del patógeno : 12 - 21 - 28 - 46 .

Los resultados que se dan en la Tabla 5 , han sido obtenidos mediante un tratamiento estadístico por el método de "bloques randomizados" , estando cada bloque constituido por 4 plantones , inoculados por nebulización sobre 5 hojas cada uno , de forma que pudieran constituir cada hoja , 4 posibles puntos de infección . Así pues , cada bloque estaba basado en 80 puntos de repetición (de posible infección ) .

Resultados (Tabla 5) :

En orden decreciente la efectividad de los productos fué : Benomyl , Thiocur y Triforina , prácticamente inefectiva.

TABLA 5 - Actividad del Benomyl, Triforina y Thiocur contra el "mal secco". Se usaron plantones de naranjo amargo de 18 meses de edad, tratados a la hoja 5 días antes de la inoculación del patógeno, siendo los productos aplicados en suspensión acuosa o con la adición al 1% de aceites minerales blancos de diversa viscosidad (209C, 2689E).

Fungicidas	Concentraciones (ppm)	Intensidad media de los síntomas al cabo de los días de inoculación:					
		28 días			35 días		
		0	209 E	2689 E	0	209 E	2689 E
Benomyl	500	0,45 AD ad	0,06 A a	0,28 AC ac	0,70 AD ad	0,13 A a	0,42 AC ac
	100	0,85 AE bf	0,63 AD ae	1,02 BE df	1,01 AE be	0,50 AC ab	1,33 BF df
Triforina	500	0,92 AE bf	1,02 BE df	1,02 BE df	2,01 EG fh	1,94 EG fh	2,01 EG fh
	100	1,18 CE eg	1,27 DF fg	1,71 EF g	2,01 EG fh	2,35 FG gh	2,52 G gh
Thiocur	500	0,83 AE bf	0,21 AB ab	0,43 AD ad	1,23 AF cf	0,36 AB ab	0,65 AD ad
	100	0,93 AE af	0,76 AB bf	1,00 BE df	1,81 EG eh	1,53 CG ef	1,68 DG eg
Testigos	---	2,06 F f	1,98 F g	2,00 F g	2,61 G h	2,56 G h	2,50 G h

(1) - La inoculación se realizó por nebulización foliar. Cada uno de los 4 plantones de cada experiencia, ha sido inoculado sobre 5 hojas, dando un total de 80 puntos de inoculación (4 por hoja)

(2) - Sobre las columnas a letras iguales corresponden valores estadísticamente no significativos para una probabilidad. Las letras mayúsculas han sido utilizadas para  $P = 0,01$ , y las minúsculas para  $P = 0,05$ .

El Benomyl fué mas efectivo aplicado con los aceites, especialmente con el de 20 °E. , y en segundo lugar con el de 268 °E. El Thiocur fué también mas eficaz con el aceite de 20 °E. y asimismo , en segundo lugar con el de 268 °E.

La efectividad de los productos en el control , al ser relacionada con la respectiva sistemicidad de los mismos , permitió observar :

El Benomyl es mas sistémico aplicado con los aceites , en particular con el de 20 °E. , todo lo cual concuerda con su efectividad de control . El Thiocur también fué mas sistémico con los aceites , especialmente con el de 20°E. por su acúmulo y persistencia . La Triforina fué mas sistémica aplicada sin aceites, y si bien no mostró prácticamente efectividad en el control de los síntomas , se observó que disminuyó algo los valores de estos , cuando los plántones fueron tratados con ella en suspensión acuosa , lo cual coincidió con su comportamiento sistémico en esta modalidad de tratamiento.

### 2.3. Discusión, -

Los ensayos realizados tenían como finalidad averiguar la efectividad de control del Thiocur y Triforina, en el desarrollo de síntomas de la enfermedad, en plantones inoculados con P. tracheiphila, siendo comparada para mayor exactitud, la actividad de estos productos con la presentada por el Benomyl de efectividad conocida.

Las pruebas "in vitro" estaban encaminadas a averiguar la actividad inhibidora de los productos, frente al crecimiento de colonias del patógeno, y pusieron en evidencia la mayor eficacia del Benomyl, y en segundo lugar del Thiocur. La Triforina por el contrario, no se mostró capaz de inhibir totalmente el desarrollo del hongo ni a concentraciones de 100 ug/ml. Por tanto, para estudiar la sistemicidad del Thiocur y Triforina, fueron seleccionados en orden a su sensibilidad P. expansum y Cl. cucumerinum

En el Diagrama 1 Tabla 1, se pudo observar especialmente una mayor actividad inhibidora de crecimiento para el Benomyl, seguida del Thiocur y por último de la Triforina.

En los ensayos de toxicidad de los productos (Fots. 1 y 2), de los tres fungicidas ensayados, solamente la Triforina se mostró fitotóxica en las dos concentraciones suministradas al terreno, de 200 y 500 ppm.

Los ensayos biológicos de sistemicidad de los productos cuando estos fueron suministrados en suspensión acuosa y aplicados en tratamiento foliar y al terreno (Tabla 2, a, b, Diagramas 2 a, b, c), se observó que en tratamiento foliar destacó el acúmulo de Triforina a 15 días de tratamiento y la persistencia del Benomyl hasta mas de 65 días. En tratamiento al terreno presentó mayor acúmulo el Thiocur a 25 días del tratamiento y en segundo lugar del Benomyl, mostrando ambos buena persistencia.

Los bioensayos de sistemicidad relativos a la actividad de los aceites minerales blancos en el comportamiento de los productos aplicados en tratamiento foliar, (Tabla 3, Diagramas 3) se observó un mayor acúmulo del Benomyl y de la Triforina en el ensayo efectuado a 15 días del tratamiento.; mientras que el Thiocur mostró el mayor acúmulo en el ensayo efectuado a 35 días del tratamiento, con el aceite de menor viscosidad (20 º E.). En general se puede decir que la adición de éste aceite ha aumentado el acúmulo del Benomyl y la persistencia del Thiocur en la planta. Estos últimos resultados concuerdan con los obtenidos en ensayos semejantes por DE CICCIO y LUISI (1.975).

En los ensayos de control de la enfermedad, cuando los productos fueron aplicados en suspensión acuosa y suministrados en tratamiento foliar (Tabla 4, a), antes de la inoculación del patógeno, redujeron la intensidad media de los síntomas presentados

por los plantones, respecto a los testigos no tratados. De las dos fechas de aplicación del tratamiento a 5 y 20 días antes de la inoculación, se obtuvo ligeramente mayor efectividad con la fecha de 5 días antes.

La eficacia obtenida con los productos si bien no alcanzó en todos los casos la significatividad estadística, evidenció una mayor efectividad del Benomyl y del Thiocur.

Los ensayos de control de la enfermedad en que los productos fueron aplicados en suspensión acuosa y tratamiento al terreno (Tabla 4, b) mostraron al ser considerados las dos medidas de control de los síntomas mas significativas y el porcentaje de plantas muertas por producto y concentración que el Benomyl y el Thiocur presentaron una eficacia contra la enfermedad respecto a los plantones no tratados utilizados como testigos, que fué altamente significativa especialmente cuando fueron suministrados antes de la inoculación del patógeno.

Los resultados relativos a la acción de los aceites sobre la actividad de los productos en la pruebas de control revelaron que el Benomyl y el Thiocur redujeron la intensidad media de los síntomas de la enfermedad de modo estadísticamente significativo, en particular cuando fueron suministrados con la adición del aceite de menor viscosidad (20ºE.). (Tabla 5)



ENSAYOS DE TOLERANCIA AL BENOMYL  
EN CEPAS DE P. TRACHEIPHILA

SCHREIBER y TOWNSEND (1.976) describen la disparidad existente en el control de Ceratocystis ulmi con Benomyl y MBC-HCL. In vitro, a ciertos aislamientos les fueron tóxicas concentraciones de 1 µg/ml.; no obstante, otros que crecieron el 30% del control a 1.000 µg/ml, en las ramas de los árboles podían soportar concentraciones no comparables.

Según WUEST et al. (1.974), los fungicidas sistémicos pueden actuar afectando la fisiología reproductiva, dañando la formación de esporas, el proceso germinativo, o ambos.

Entre los ensayos realizados "in vitro" para determinar la acción inhibidora de estos fungicidas, se citan los efectuados por WUEST et al. (1.974) valorando la sensibilidad de cepas de Penicillium malthousei frente al Benomyl, , midiendo el crecimiento micelial, esporulación y germinabilidad de esporas.

KURAMOTO (1.976) realizó pruebas con aislamientos de Penicillium digitatum y P. italicum en relación al Benomyl y Metiltiofanato, cuya finalidad consistía en determinar la mínima cantidad de fungicida en que no aparece crecimiento y la máxima cantidad que no lo afecta. Se valió para ello de la medida del diámetro de creci-

miento de las colonias. Entre sus observaciones sugiere, que a bajas concentraciones suele ser difícil determinar la máxima concentración que no inhibe el crecimiento.

Una serie de indagaciones han sido encaminadas para - determinar la tolerancia natural de aislamientos provenientes de plantaciones no tratadas. HARDING (1.972) verificó estudios en cepas de Penicillium digitatum y P. italicum frente al Tiabendazolo. WUEST et al. (1.973) con aislamientos de Verticillium malthousei en relación al Benomyl. SCHREIBER y TOWNSEND (1.976) con cepas de Ceratocystis ulmi frente a MBH-HCL

Relativo a la tolerancia a fungicidas WUEST et al. (1974) señalaron que puede ser expresada de distintas formas.

MACKENZIE (1.970) y MACKENZIE et al. (1.971), observaron que en Cochliobolus carbonum Nelson, existía un gen tolerante a los compuestos de Cadmio y al antibiótico Actidione, expresándose esta resistencia en un aumento de la tasa de crecimiento y en una reducción en la germinación de esporas.

Estudios de WUEST et al. (1.974) expresan que ha sido observado el hecho de que el factor tolerancia no es suficiente para la supervivencia de una cepa, ya que en la población de un parásito pueden desaparecer cepas tolerantes independientemente de ser tratado el campo o no. Tal suceso lo atribuyen a que para sobrevivir una cepa resistente necesitaría disponer de otras particularidades,

como capacidad reproductiva y patogénica competente en relación con la cepas sensibles en convivencia.

De igual modo, estos y otros autores señalan que para ser significativa en campo la tolerancia a fungicidas, un aislamiento debe mostrar en cultivo una medida de tolerancia combinada con -- otras características esenciales para la supervivencia como agresividad y virulencia. Así pues, se podrían conseguir medidas en el control de una enfermedad.

Sobre tal posibilidad de control elaboraron ensayos HOLMES et al. (1.971) y ERCEGOVICH et al. (1.973) en cultivos de -- champiñón afectados de Verticillium utilizando Benomyl.

Otras anotaciones en torno a la supervivencia de una raza tolerante se deben a BOLLEN y SCHOLTEN (1.971) quienes exponen que este factor depende asimismo de su virulencia y esporulación.

SCHREIBER y TOWNSEND (1.976) anotan que existen razas tolerantes con menor capacidad reproductiva y patogénica que las sensibles.

WARREN et al. (1.974) en el control de Sclerotinia homo-eocarpa frente a compuesto benzimidazólicos, y LITTRELL (1.974) con Cercospora arachidicola frente al Benomyl y compuestos relacionados, tratan de la capacidad de las razas tolerantes para sobrevivir en áreas de control con razas sensibles.

Relativo a la variación de tolerancia en aislamientos de

una misma especie, SCHREIBER y TOWNSEND (1.976) realizaron estudios con Ceratocystis ulmi, frente al MBC-HCL proveniente de regiones distantes. La amplia variación observada les sugirió la existencia de un gen múltiple para el control de este carácter. De igual modo evidenciaron que tal variación tenía lugar dentro de una misma área, incluso localidad.

En cuanto al desarrollo de tolerancia a fungicidas en áreas de control, parece que se lleva a cabo, por la efectividad de los mismos en su aplicación durante años sucesivos.

SCHREIBER y TOWNSEND (1.976) exponen que relacionado con este desarrollo de tolerancia, los tratamientos efectuados en el curso de una infección han dado resultados negativos o inefectivos, debido al desarrollo de cepas con altos niveles de tolerancia. La bibliografía cita casos relativos al Benomyl y otros compuestos benzimidazólicos.

GOLDBERG y COLE (1.973) indican la ineffectividad de tratamientos con Benomyl en campos de golf comercial en el control de Sclerotinia homoeocarpa, a causa de que las cepas sensibles habían sido exterminadas, quedando las tolerantes.

BOLLEN y SCHOLTEN (1.971) reportan un caso similar en el control de Botrytis cinerea con Benomyl en un campo de ciclámenes, donde posteriormente a los tratamientos fué asilada con gran frecuencia la raza resistente. Tal ocurrencia, pensaron estaba fun-

damentada, no a que esta fuese de gran virulencia, sino a la extinción por el fungicida de las razas sensibles antagónicas.

KURAMOTO (1.976) observó que se aislan con mayor frecuencia razas resistentes de campos tratados. Una de sus experiencias consistió en determinar la frecuencia entre el número de tratamientos efectuados en un periodo de tiempo, la clase de fungicida y la frecuencia de razas resistentes. Según el mismo autor, el aumento o disminución de números de razas resistentes tras un intervalo de tratamiento es la consideración más importante en el control de una enfermedad. Añade, que generalmente es aceptado el hecho de que los tratamientos incrementan el número de razas tolerantes debido a la selectividad por las razas.

La determinación de resistencia natural o adquirida en aislamientos provenientes de campos tratados, es problemática, ya que actualmente estamos al inicio de los estudios sobre conocimientos relativos a supervivencia potencial y patogenicidad de aislamientos fungicida-tolerantes en experiencias de campo, MACKENZIE et al. (1.971) SCHROEDER y PROVVIDENTI (1.969).

BOLLEN y SCHOLTEN (1.971) afirman que la mayoría de los hongos patógenos son sensibles al Benomyl; no obstante, se conocen entre ellos algunos casos de resistencia, si bien pocos de tolerancia adquirida.

Casos de tolerancia adquirida por radiación ultravioleta,

datan de BEN-YEPEF et al. (1.974), que desarrollaron mutaciones Benomyl-tolerantes en Ustilago hordei.

BOLLEN y SCHOLTEN (1.971) en experiencias con cepas de Botrytis cinerea procedentes de campos de ciclámenes tratados con Benomyl, sugieren como resistencia adquirida, la mostrada por un aislamiento altamente tolerante. No obstante tal suposición fué debatida por WUEST et al. (1.974) por considerarla poco fundamentada.

El hecho de que la referida cepa soportara "in vitro" - concentraciones de 2.000 µg/ml, hizo pensar a tales autores, si por su similitud estaría realacionada con los grupos de resistencia específicos existentes en Oomicetos, Mucorales. Por otra parte la imprevista aparición de tal resistencia y su magnitud, comparada con la presentada por los otros aislamientos de igual especie, les sugirió la posibilidad de haber sido originada por una mutación (sensu lato).

Por último, cabe citar que muchos autores frente a cepas que presentan un alto nivel de tolerancia, intentan probar si asumen una resistencia múltiple. A este respecto, KURAMOTO (1.976), in dica que muchos casos de resistencia cruzada se deben a que los fungicidas tienen igual mecanismo de acción.

Presentamos en este capítulo los resultados de una serie de pruebas "in vitro" encaminadas al estudio comparativo de la resistencia al Benomyl de diferentes cepas del agente causal del "mal secco" provenientes de plantaciones tratadas y no tratadas, con objeto de detectar las posibles modificaciones en la sensibilidad de estas, ocasionadas por los sucesivos tratamientos con Benomyl.

La idea de este trabajo surgió de que si bien es conocida la actividad profiláctica y terapéutica de este fungicida y sus derivados en el control de diversas alteraciones, recientemente -- han aparecido numerosas referencias sobre la ineficacia del Benomyl y otros compuestos benzimidazólicos utilizados en el control de numerosas enfermedades, después que dichos fungicidas habían sido utilizados con éxito en experiencias durante varios años. Estos fracasos han sido motivados por la aparición de cepas del patógeno, dotadas de tolerancia o resistencia a estos fungicidas, según BOLLEN y SCHOLTEN (1.971), WUEST et al. (1.974), LITRELL (1.974) SCREIBER Y TOWNSEND (1.976) y KURAMOTO (1.976). Así pues, esta aparición de tolerancia ha movido a diferentes autores a iniciar el estudio de la resistencia que cepas de diversos patógenos, presentan a estos u otros fungicidas sistémicos.

Los hongos patógenos como la mayor parte de los microorganismos, presentan una gran variabilidad y una rápida suce--



sión de generaciones, lo que facilita la adaptación de las poblaciones a nuevos factores ambientales.

Dichas poblaciones cuando se encuentran ante un producto antiparasitario, son sometidas a una selección que favorece el desarrollo de aquellas mutaciones o recombinaciones genéticas que confieren resistencia a dicho producto. Es posible de igual forma que se seleccionen combinaciones hereditarias pre-existent, que con el transcurso del tiempo acaban por prevalecer sobre el resto de las poblaciones del patógeno, según los trabajos de --- WUEST et al. (1.974) SCHREIBER y TOWNSEND (1.976) y LUISI (1.977).

Considerando que en la actualidad el Benomyl es muy aplicado en pruebas de control del "mal secco" de los agrios, SALLERNO et al. (1.976) y disponiendo en Sicilia de plantaciones de limonero tratadas, nos ha parecido oportuno la realización de este estudio.

Así pues, con idea de determinar el grado y naturaleza de una eventual tolerancia, se realizaron ensayos "in vitro", en los que el producto se suministró a varias concentraciones que fueron incluidas en el sustrato, con el fin de observar la actividad del Benomyl frente al crecimiento de colonias de P. tracheiphila siendo consideradas como tolerantes aquellas que soportan o crecen a una dosis crítica de fungicida.

La elaboración de este tipo de ensayos, se justifica desde el punto de vista práctico, por el hecho de que la detección - de tolerancia en cepas de una especie, constituye un importante dato en la elaboración de un calendario de tratamientos en campo, - que permite establecer la frecuencia de aplicación, época, especialmente relacionada con los periodos de infección, y conveniencia de alternar el suministro de un producto con otro de distinto principio activo, con objeto de evitar la aparición de fenómenos de tolerancia y adaptación.

Por tales motivos, dado el creciente uso de fungicidas en campo, y enfocando el problema desde nuestra línea de investigación centrada en el control del "mal secco" de los agrios, se ha creído oportuno averiguar la posible influencia que tres años de sucesivos tratamientos en campo con Benomyl, podrían ocasionar sobre la sensibilidad de poblaciones del patógeno.

Con esta finalidad, se planificó un muestreo en plantaciones tratadas, y en otras que nunca lo habían sido, de cuyo material se realizaron aislamientos que fueron utilizados en una serie de pruebas "in vitro" para realizar un estudio comparativo de su comportamiento.

Tales pruebas consistieron inicialmente, en obtener colonias puras a partir de estos aislamientos, que posteriormente serían transferidas a placas con el substrato adicionado de Benomyl

a diversas concentraciones, para después confrontar periódicamente el crecimiento de las colonias de una y otra procedencia, lo cual nos llevaría a conocer la acción de los tratamientos sobre las diferentes poblaciones del hongo.

Por otra parte para averiguar si dosis distintas de fungicida aplicadas en campo o si los diferentes factores ecológicos de la zona en que estaban situadas las plantaciones, podían influir en la tolerancia de la cepas, se eligieron plantaciones tratadas a diferentes dosis y de zonas distantes.

### 3.1.- Material y métodos.

Las muestras consistían en trozos de ramas de limonero afectadas de "mal secco", que habían sido recogidas de plantaciones tratadas con Benlate, como de cultivos que nunca habían sido tratados, (el Benlate consiste en polvo soluble que contiene el 50% de principio activo, Benomyl).

De los campos tratados, unos pertenecían a Giarre (Catania) donde se habían aplicado dos concentraciones del producto comercial del 0,05 y 0,1 % respectivamente, y otros pertenecían a Floridia (Siracusa), que habían recibido una sola concentración del producto del 0,1 %.

Para ambas localidades, los tratamientos habían sido 5 por año, en la mitad de septiembre y final de febrero a primeros de marzo, durante 3 años consecutivos.

De cada tipo de plantación, según su procedencia y dosis de fungicida recibida o ausencia de tratamientos, se recogieron 10 fragmentos de ramas afectadas, de los que se aisló el hongo en laboratorio, con el fin de obtener cultivos del patógeno puros, siendo 80 el número de cepas de P. tracheiphila aisladas.

Las pruebas fueron efectuadas en termostato a la temperatura de 20°C y en la oscuridad. Se utilizaron placas de Petri que contenían como sustrato agar-patata-sacarosa adicionado con diversas concentraciones de Benomyl, siendo sembradas con discos de 5 mm. de diámetro procedentes del margen de colonias de 10-20 días de edad.

Dichas placas tenían un diámetro de 90 mm y contenían 15 ml. de sustrato cada una, a un pH variable entre 5,6 y 5,9 antes de la adición de fungicida. Esta adición se verificaba incluyendo la solución de sus diferentes concentraciones en el sustrato en el momento de verter este en placa, uniformando previamente a 50°C al baño maría, las temperaturas de los matraces contenidos de las respectivas dosis de sustrato, para evitar la degradación del fungicida.

El diámetro medio de las colonias relativas a cada experiencia, correspondió a un número de lecturas: nº de cepas utilizadas en la prueba x nº de repeticiones en cada una. En las concentraciones, a las que no todas las colonias crecieran, el diámetro medio estaría referido solamente a los aislamientos que presentaron crecimiento.

La medida del crecimiento de las colonias se realizaba al cabo de los tres, siete, catorce y veintiun días de la siembra y consistía en observar el número y diámetro medio de las colonias que habían crecido para cada experiencia.

Finalmente, para determinar si el efecto del Benomyl había sido fungicida o fungistático en las colonias que se consideraran sensibles, se transfirieron fragmentos de colonias que después de 12 días no presentaron crecimiento sobre substrato adicionado de Benomyl a concentraciones respectivamente de 10 y 100 µg/ml. a substratos sin fungicida.

### 3.2. Pruebas y resultados. -

3.2.1.- Inicialmente se llevaron a cabo una serie de Pruebas preliminares, con objeto de conseguir una orientación sobre la actividad del Benomyl frente al crecimiento de las colonias.

Como testigos se utilizaron aislamientos que procedían

de plantaciones no tratadas de Siracusa (Sicilia).

Las concentraciones fueron establecidas dentro de un amplio intervalo, de forma que no quedase excluida la dosis de inhibición total, siendo dichas concentraciones de: 0-1-10-100-1000  $\mu\text{g/ml}$ .

Las colonias crecidas a 0  $\mu\text{g/ml}$ ., se consideraron - testigos.

El número de colonias crecidas y su diámetro a cada concentración, eran medidos cada 48 h., en las tres primeras medidas, y a partir de la tercera, se realizaron a intervalos crecientes de tiempo.

#### Resultados:

- A 1  $\mu\text{g/ml}$ ., no hubo inhibición aparente, crecieron todas las colonias, no presentando diferencias de diámetros de crecimiento con los testigos.

- A 10  $\mu\text{g/ml}$ ., se manifestó una fuerte inhibición. Crecieron un pequeño número de colonias, presentando estas un diámetro de crecimiento muy reducido. El mayor número de placas mostraba el círculo inicial de micelio transferido destruido, a excepción de un bajo número de placas en las que se observaba que dicho círculo había soportado la dosis, si bien no mostraba crecimiento.

- A 100  $\mu\text{g/ml}$ ., la inhibición fué del 100%.

Considerando los resultados obtenidos en estos primeros ensayos, y con el fin de confirmar la alta inhibición a 10 µg/ml así como de observar si a 100 µg/ml., se verificaba una inhibición del 100%, se estableció la siguiente prueba:

3.2.2 .- 1ª Prueba. - Las concentraciones utilizadas fueron: 0-1-10-100 µg/ml., que además de servir para confirmar la inhibición a 10 y 100 µg/ml. serían utilizadas para comparar la sensibilidad de las colonias provenientes de campos tratados y no tratados, así como para poner de manifiesto la posible influencia de las diferentes dosis aplicadas en los campos tratados y si las diferencias ecológicas de las plantaciones muestreadas, influían en la sensibilidad de las cepas.

Los aislamientos provenientes de campos tratados -- pertenecían a plantaciones de Giarre (Catania) que habían sido tratadas a 0,1 y 0,05 % de Banlate, y de Floridia (Siracusa) tratadas al 0,1%. Asimismo se utilizaron aislamientos de campos no tratados.

Al ensayar cepas de 4 localidades diferentes (3 de -- campos tratados y una de campos no tratados), a 4 concentraciones, se obtuvieron en la prueba un total de 16 experiencias.

Se utilizaron 5 cepas de los aislamientos de cada origen, efectuándose 4 placas por cada una de ellas, obteniéndose un

total de 20 placas por experiencia.

El diámetro medio de crecimiento en cada experiencia pertenecía solamente a las colonias que presentaron crecimiento, y en las experiencias, a cuyas dosis utilizadas presentaron crecimiento todas las colonias, el diámetro medio estaría referido a un número igual al número de placas sembradas (20).

Las tres primeras medidas del diámetro de crecimiento de las colonias, se realizó semanalmente, valorándose especialmente la tercera, ya que en ésta podrían haber estabilizado su crecimiento las colonias que en las medidas anteriores no lo hubieron hecho por frenar el fungicida su crecimiento, puesto que a la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ . en los ensayos preliminares se observó una marcada diferencia de comportamiento en el crecimiento.

#### Resultados (Tabla 6)

- A concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ ., no se observó inhibición aparente de crecimiento, ya que la media de crecimiento de las colonias de cada experiencia era igual que la que presentaban a 0  $\mu\text{g/ml}$ .

- A 10  $\mu\text{g/ml}$ ., se dió por el contrario una fuerte inhibición, oscilando la reducción del número de colonias que presentaban crecimiento, entre el 70 y el 90 %, De campos tratados a dosis de 0,1% de Benlate, dicha reducción osciló entre el 70 y el 74%, para campos tratados a 0,05 % de Benlate, la reducción del



TABLA 6.- Comportamiento de cepas de *P. irachishihila*, provenientes de campos tratados con Benlate durante tres años consecutivos y de campos no tratados, frente a diversas concentraciones de Benomyl.

Diámetro medio (mm) de las colonias crecidas sobre PDA con diversas concentraciones de producto. Entre paréntesis se indican los porcentajes de las colonias que han presentado crecimiento (b)														
		7 días				14 días				21 días				
Origen de las muestras	Concentraciones de Benlate (%) en los tratamientos en campo	Concentraciones de Benomyl (ug/ml.) en el sustrato				Concentraciones de Benomyl (ug/ml.) en el sustrato				Concentraciones de Benomyl (ug/ml.) en el sustrato				
		0	1	10	100	0	1	10	100	0	1	10	100	
Plantas tratadas														
Florida (Siracusa)	0,10 (mm)	40,1 (100)	43,7 (100)	8,0 (25)	0,0 (0)	68,6 (100)	73,8 (100)	12,6 (30)	0,0 (0)	72,5 (100)	74,9 (100)	19,0 (30)	0,0 (0)	
	(%)													
Giarre (Catania)	0,10 (mm)	46,2 (100)	42,1 (100)	8,4 (25)	0,0 (0)	71,0 (100)	66,5 (100)	13,0 (25)	0,0 (0)	76,3 (100)	69,3 (100)	18,3 (26)	0,0 (0)	
	(%)													
	0,05 (mm)	49,2 (100)	49,3 (100)	8,0 (10)	0,0 (0)	73,2 (100)	73,1 (100)	11,2 (20)	0,0 (0)	76,0 (100)	74,1 (100)	14,2 (20)	0,0 (0)	
	(%)													
Plantas no tratadas	---- (mm)	47,1 (100)	49,1 (100)	6,0 (5)	0,0 (0)	63,7 (100)	73,1 (100)	9,5 (10)	0,0 (0)	72,5 (100)	75,6 (100)	13,0 (10)	0,0 (0)	
	(%)													

(a).- Cada dato es la media de los diámetros de las colonias que han crecido.

(b).- Para cada experiencia (16 en total) se han utilizado 5 cepas, realizándose cuatro repeticiones por cada una (total 20 repeticiones por experiencia).

número de colonias fué del 80% y de las cepas procedentes de campos no tratados, la reducción fué del 90%. Por otra parte, el crecimiento que presentaban las colonias crecidas, fué muy limitado. Aproximadamente la reducción media de crecimiento para las colonias de cepas provenientes de campos tratados al 0,1% de Benlate fué del 76% respecto a la media de crecimiento que presentaban a 0 µg/ml., y de aproximadamente el 81,6% para las colonias provenientes de plantaciones tratadas a 0,05% de Benlate, y del 82% -- aproximadamente para las colonias procedentes de campos no tratados.

A parte estas placas cuyas colonias presentaban crecimiento, en un pequeño número de placas se observó que el círculo de micelio inicialmente transferido, si bien no había crecido, había soportado la dosis. De las restantes placas, que constituían el mayor número, el círculo de micelio transferido había sido destruido.

Relativo a la influencia ecológica en la sensibilidad de las colonias, no se observó ninguna diferencia ni en el número de cepas crecidas, ni entre las medias de crecimiento de las experiencias cuyas cepas procedían de plantaciones tratadas a igual dosis de Benlate (0,1%) de Giarre y Floridia.

- A concentración de 100 µg/ml., la inhibición fué del 100%, demostrándose la existencia de una inhibición total a esta -

dosis de fungicida.

Así pues, a partir de los resultados obtenidos en esta primera prueba, se observó que las colonias que provenían de campos tratados, presentaban el mayor porcentaje de colonias crecidas y el mayor diámetro de las mismas. Por tanto, al revelarse la concentración de 10 µg/ml. como crítica en el crecimiento de las cepas ensayadas, y considerando la inhibición total obtenida a 100 µg/ml., se estructuró la siguiente prueba:

3.2.3.-2ª Prueba. Se trató de estudiar la inhibición en el entorno de la concentración de 10µg/ml., y de averiguar si a concentraciones menores a 100 µg/ml. se daba inhibición total, así como de realizar un estudio comparativo de la sensibilidad al Benomyl de campos tratados y no tratados, de los tratados a la misma dosis, y de averiguar la posible influencia de los factores ecológicos en la sensibilidad de las cepas de los distintos orígenes.

Se establecieron las siguientes concentraciones: 0-1,25- 2,5- 5- 10- 20- 40- 80 µg/ml.

Las cepas ensayadas fueron las mismas utilizadas en la primera prueba, es decir, de cuatro orígenes diferentes: plantaciones de Giarre (Catania), tratadas al 0,1% y al 0,05% de Benlate, de Floridia (Siracusa) al 0,1% , y de campos no tratados .

Al ensayar colonias de 4 orígenes diferentes a 8 concentraciones de fungicida, se obtuvieron un total de 32 experiencias. Para cada experiencia, se emplearon 5 cepas, realizándose 3 placas de repetición para cada una de ellas, obteniéndose un total de 15 placas de repetición por experiencia. El hecho de haber disminuido el número de placas de repetición (3), en relación a las 5 utilizadas en la primera prueba, se debe a que sería enorme el número de éstas por ser mayor el número de concentraciones establecidas.

El diámetro medio de crecimiento en cada ensayo se refirió asimismo, al número de colonias crecidas. Por tanto, en las concentraciones que presentaran crecimiento todas las colonias el número a que se refirió el diámetro medio fué 32 (el número total de placas de repetición por ensayo).

Las medidas de los diámetros de crecimiento de las colonias se realizaron semanalmente, aunque se valoró especialmente el tercero, por la razón expuesta al respecto en la 1ª prueba.

#### Resultados (Tabla 7, Fót. 3, Fig. 1)

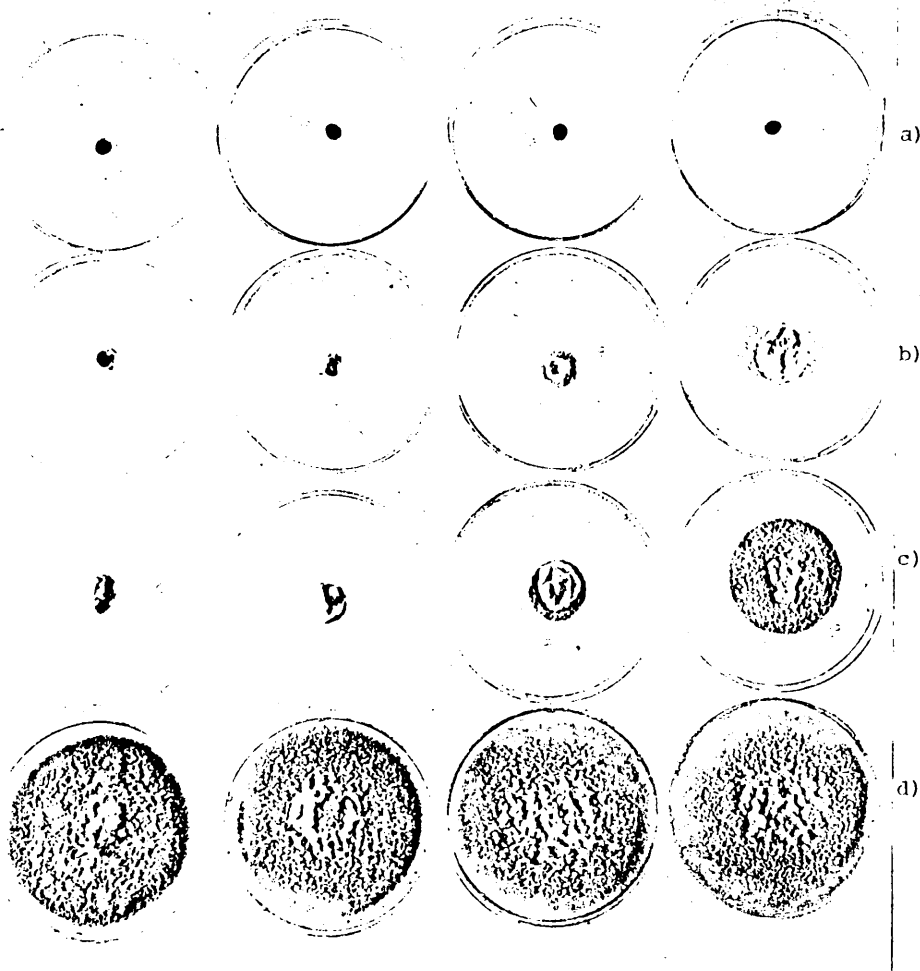
- A las concentraciones de 1,25 y 2,5  $\mu\text{g/ml.}$ , no se apreció reducción del diámetro medio de las colonias, así como tampoco en el número de colonias crecidas en las medidas de control efectuadas en la tercera semana.

**TABLA 7 .- Comportamiento de cepas de *P. Trachinella*, provenientes de campos tratados con Benlate durante tres años consecutivos y de campos no tratados, frente a diversas concentraciones de Benomyl.**

Origen de las muestras	Concentraciones de Benlate (%) en los tratamientos en campo.	Medidas de las colonias al cabo de:												Entre paréntesis se indican los porcentajes de las colonias que han presentado crecimiento (b)
		7 días						21 días						
		Concentraciones de Benomyl (ug/ml.) en el sustrato						Concentraciones de Benomyl (ug/ml.) en el sustrato						
		0	1,25	2,5	5	10	20	0	1,25	2,5	5	10	20	
Plantas tratadas														
Florida (Siracusa)	0,10	(mm)	41,5	42,2	33,5	19,0	9,8	0,0	73,5	78,4	75,0	44,6	18,8	0,0
		(%)	(100)	(100)	(100)	(80)	(11,5)	(0,0)	(100)	(100)	(100)	(100)	(42,1)	(0,0)
	0,10	(mm)	42,2	42,8	36,2	18,2	10,4	0,0	77,2	75,0	74,3	42,5	20,0	0,0
		(%)	(100)	(100)	(100)	(76,0)	(12,6)	(0,0)	(100)	(100)	(100)	(100)	(45,0)	(0,0)
Giarre (Catanis)	0,05	(mm)	44,3	43,0	32,0	13,8	7,5	0,0	77,4	74,0	73,3	38,0	13,9	0,0
		(%)	(100)	(100)	(100)	(60,0)	(6,6)	(0,0)	(100)	(100)	(100)	(100)	(26,0)	(0,0)
Plantas no tratadas														
---	---	(mm)	43,4	44,1	31,6	8,3	5,4	0,0	75,5	76,0	67,8	25,0	10,5	0,0
		(%)	(100)	(100)	(94,0)	(45,0)	(2,5)	(0,0)	(100)	(100)	(100)	(90,0)	(7,0)	(0,0)

(a) - Cada dato es la media de los diámetros de la colonias que han crecido.

(b).- Para cada experiencia (32 en total), se han utilizado 5 cepas, realizándose 3 repeticiones por cada una (total 15 repeticiones por experiencia)



Fot. 1.- Accion fungitoxica ejercida por el Benomyl frente a P. tracheiphila : d) Testigos crecidos sobre PDA no adicionado de producto. c), b) y a) Colonias crecidas sobre PDA adicionado con Benomyl , respectivamente a concentraciones de 5 - 10 y 20 ug/ml.

FIGURA 1 DISTRIBUCION DE LOS AISLAMIENOS DE *P. TRACHEIPHILA* TOLERANTES AL BENOMYL EN RELACION A LA MINIMA CONCENTRACION DE INHIBICION



- A 5 µg/ml., la reducción del diámetro de crecimiento de las colonias fué del 42% para las colonias de las cepas provenientes de las plantaciones tratadas con Benlate al 0,1%, y del 51% para las colonias de cepas provenientes de campos tratados con Benlate al 0,05 %, siendo la reducción del 67% para las colonias provenientes de árboles no tratados.

- A 10 µg/ml., se dió una fuerte inhibición en el número de colonias crecidas, que osciló entre el 55 y el 58% para las cepas provenientes de plantas tratadas con Benlate a la dosis de 0,1%, siendo dicha reducción del 74% para los aislamientos procedentes de plantaciones tratadas al 0,05% de Benlate, y del 93 % para las colonias procedentes de campos no tratados.

Asimismo, la reducción del diámetro de las colonias respecto al que presentaban los aislamientos de cada origen a 0µg/ml., de Benomyl fué del 75% para las colonias de cepas provenientes de árboles tratados con Benlate a dosis de 0,1%, del 82% fué la reducción del diámetro de cepas provenientes de plantaciones tratadas con Benlate al 0,05%, y del 86,5 % para las cepas de campos no tratados.

- A 20 - 40 - 80 µg/ml., la inhibición fué del 100%, es decir, a 20 µg/ml. se dió para las colonias una inhibición total.

Así pues, a partir de los resultados de esta segunda prueba, quedó confirmada la concentración de 10 µg/ml., como



concentración diferencial de la tolerancia al Benomyl de las colonias y la inhibición en su entorno especialmente a 5 µg/ml., dosis en que comenzaba a mostrarse una inhibición significativa en el crecimiento de las colonias, y a 20 µg/ml. en la inhibición era ya del 100%.

3.2.4.-3ª Prueba - Tenía por finalidad concretar con mayor exactitud el comportamiento de las colonias a la concentración crítica de 10 µg/ml., de forma que al considerar los resultados obtenidos en las anteriores pruebas se pudiera estudiar con mayor exactitud la tolerancia observada y deducir la acción del producto durante los años de tratamiento en campo sobre las poblaciones de P. trachiphila.

Se utilizaron cepas de campos tratados a concentración de 0,1% de Benlate, y de campos no tratados, que constituyeron dos experiencias en la prueba.

En cada ensayo se efectuaron 100 placas de repetición, estando referida la media del diámetro de las colonias de cada experiencia al número de colonias que presentaron crecimiento. Las medidas de los diámetros de las colonias se efectuaron a los 9 - 18 - 26 días.

Los resultados que se dan en la Tabla 8 b, han sido obtenidos mediante un tratamiento estadístico, por el método

de "randomización completa" , siendo utilizadas 100placas de repetición para los aislamientos de cada origen .

Resultados : (Tabla 8 a , b )

- Crecieron el 23 % de las colonias del total de placas sembradas , si bién un bajo número de estas soportaron la dosis de fungicida , si bien no crecieron. Como en las pruebas anteriores , el mayor número de placas presentó el círculo de micelio inicialmente transferido , destruido .

El número de colonias crecidas provenientes de campos tratados fué del 35 % , siendo el número de colonias crecidas provenientes de campos no tratados del 11 % .

- El diámetro medio de crecimiento de colonias crecidas provenientes de campos tratados fué de 8,28 mm , y el de las procedentes de campos no tratados , de 3,7 mm .

TABLA 8 a - Inhibición del crecimiento de aislamientos de P. tracheiphila provenientes de campos tratados y no tratados sobre FDA adicionando con 10 µg/ml. de Benomyl.

Origen de las muestras	Diametro medio (mm.) y porcentaje de las colonias crecidas al cabo de los dias:																		% de colonias crecidas	
	9 dias									26 dias										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8		9
Plantas tratadas con Benlate al 0,1 %	5,1	0,0	0,0	4,4	0,0	1,4	1,2	3,0	0,0	2,6	7,4	6,8	5,6	10,3	2,8	12,6	4,2	14,4	5,6	8,4
	2,0	---	---	1,0	---	0,5	0,5	2,5	---	0,5	2,0	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0	4,0	1,5	0,0
Plantas no tratadas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	1,8	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	11,6	6,0	0,8
	---	---	---	---	---	---	---	0,5	---	---	1,0	---	1,0	---	---	---	---	1,5	1,5	0,5
																				5,5

(1). - Se utilizaron 10 cepas de los aislamientos de cada procedencia, realizándose 10 placas de repetición por cada una.

TABLA 8 b. - Inhibición del crecimiento de aislamientos de *P. tracheiphila* provenientes de campos tratados y no tratados, sobre PDA a concentración de 10 ug/ml de Benomyl.

Origen de las muestras	Diámetro medio (mm) y porcentajes de las colonias crecidas al cabo de:		
	9 días	18 días	26 días
Plantas tratadas con Benlate al 0,1 %	9,3 (11,5 %)	13,2 (35,0 %)	17,8 (39,1 %)
Plantas no tratadas	7,0 (1,0 %)	9,6 (4,9 %)	11,5 (7,0 %)

- (a). - Cada dato es la media de los diámetros de las colonias que han crecido.
- (b). - Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes de las colonias crecidas.
- (c). - Las diferencias entre los diámetros medios de crecimiento y porcentaje de colonias crecidas de cepas provenientes de campos tratados y no tratados han sido en cada toma de medidas, estadísticamente significativas para  $P = 0,01$ .
- (d). - De los aislamientos de cada origen, se efectuaron 100 placas de repetición.

3.2.5.- 4ª Prueba. Finalmente, fué establecida una experiencia con las cepas del hongo que después de 12 días de permanencia en placa con substrato adicionado de Benomyl, respectivamente a las concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{g/ml.}$ , no habían presentado crecimiento, efectuándose siembra a partir de dichas cepas en placas con substrato sin adición de fungicida, para observar -- cuando el producto había actuado como fungicida o como fungiestático.

Se utilizaron 3 cepas de aislamientos procedentes de campos tratados y 3 de campos no tratados. De cada cepa se realizaron 10 placas de repetición, obteniéndose un total de 30 placas para los aislamientos de cada procedencia.

Tras la siembra, se observó periódicamente el número de colonias crecidas así como su diámetro medio.

#### Resultados (Tabla 9)

- Las placas sembradas con material proveniente de placas con el substrato adicionado de Benomyl a concentración de 10  $\mu\text{g/ml.}$ , mostraron crecimiento en el 60% de las colonias -- provenientes de plantaciones tratadas, y del 45% relativas a campos no tratados.

- Por otra parte, el diámetro medio de las colonias provenientes de campos tratados, fué de 70 mm., siendo de 48 mm el presentado por las colonias crecidas provenientes de campos no

TABLA 9 - Diámetro de las colonias (mm.) y número (%) de cepas de P. trachiphila que presentaron crecimiento sobre PDA. Para efectuar las siembras se han utilizado fragmentos de los discos de colonia que después de 12 días no habían crecido sobre PDA adicionado con Benomyl, a 10 y 100 µg/ml.

Origen de las muestras	Medida de las colonias al cabo de:					
	10 días		20 días		Concentraciones de Benomyl que habían impedido el crecimiento de las colonias.	
	10	100	10	100		
Plantas tratadas con	(mm)	26	0	70	0	0
Benlate al 0,1%	(%)	43	0	60	0	0
Plantas no tratadas	(mm)	15	0	48	0	0
	(%)	26	0	45	0	0

tratados.

- En cuanto al material transferido a partir de las placas en cuyo substrato el Benomyl había sido incluido a concentración de 100 µg/ml., no se observó crecimiento.

Finalmente, cabe citar que las colonias que crecieron a 10 µg/ml. en todas las pruebas realizadas fueron transferidas a tubos de ensayos, con idea de estudiar su resistencia en posteriores ensayos, - así como su epidemiología. Sobre éste último aspecto, existen estudios de MACKENZIE et al. (1.972) en Cochliobolus carbonum.

### 3.3 Discusión

Se ha tratado de estudiar la acción del Benomyl sobre poblaciones de P. tracheiphila que había sido sometidas durante 3 años consecutivos a tratamientos en campo; a dosis de -- Benlate del 0,1 y 0,05 %, por lo que se realizaron una serie de pruebas "in vitro" en que el substrato era adicionado de diversas dosis de Benomyl, comparándose el comportamiento de aislamientos procedentes de campos tratados y no tratados. Asimismo se intentó averiguar si las diferentes dosis aplicadas en campo habían influido sobre la sensibilidad de las cepas, y de igual forma las diferencias ecológicas de las plantaciones muestreadas

De las concentraciones utilizadas, ya a la de 5 ug/ml. se observó una reducción del número de colonias de cepas -- procedentes de campos no tratados y una reducción del diámetro, de crecimiento tanto es éstas, como en las provenientes de campos tratados, si bien menor.

No obstante, la concentración de 10 ug/ml. se consideró crítica en cuanto a que permitía diferenciar el comportamiento de las colonias en orden a su sensibilidad o resistencia al Benomyl. Las colonias que presentaron crecimiento a esta dosis se consideraron tolerantes; las que no crecieron pero soportaron



la dosis, se dedujo que era la máxima que podían soportar, constituyendo su "umbral de tolerancia"; por último las placas en las -- que el círculo de micelio transferido inicialmente aparecía destruido, se consideraron sensibles.

Los resultados obtenidos a través de las diferentes pruebas, nos permitieron realizar las siguientes observaciones:

Existen cepas tolerantes tanto en campos tratados como no tratados, lo que hace suponer la existencia de una tolerancia natural en ellos, hecho que concuerda con los estudios realizados por HARDING (1.972), WUEST et al. (1.974), SCHREIBER y TOWNSEND (1.976).

La frecuencia de la presencia de cepas tolerantes resultó ser de 4 a 6 veces mayor en cepas provenientes de campos tratados, lo que nos permite concluir que el efecto del fungicida in cidió mas que en la aparición del fenómeno de tolerancia, en la -- frecuencia de cepas tolerantes, al seleccionar el producto las poblaciones del patógeno. Dicha acción selectiva está de acuerdo con las observaciones realizadas por BOLLEN y SHOLTEN (1971) y GOLDBERG y COLE (1.973). Lógicamente, al ser eliminadas las cepas sensibles por acción del fungicida en los campos tratados, se aíslan con mayor frecuencia las resistentes, hecho que es tá en concordancia con los trabajos de KURAMOTO (1.976).

De igual forma, el fenómeno de acción selectiva del producto actuó sobre las cepas procedentes de campos no tratados a través de las pruebas "in vitro" efectuadas.

Cabe considerar, que los sucesivos tratamientos en campo van eliminando las cepas sensibles; paralelamente, las cepas sensibles que van quedando tienen menor capacidad de producción por la presencia del Benomyl. Este razonamiento concuerda con los resultados obtenidos en la última prueba, en que se observaba que el producto actuaba más veces como fungistático que como fungicida sobre las cepas sensibles provenientes de campos tratados, ya que reafirma la acción selectiva del Benomyl en los campos tratados.

Inversamente ocurre con las cepas tolerantes, que en las poblaciones de los campos tratados cada vez existirán en mayor número, a parte de que posiblemente el contacto con el producto durante los años de tratamiento les facilitará una cierta adaptación al mismo, lo que puede constituir una razón que contribuya a que en las pruebas "in vitro" presenten mayor número y diámetro de crecimiento generalmente que las cepas de campos no tratados por soportar mejor el fungicida.

En relación a la posible influencia de los factores ecológicos en la sensibilidad de las cepas de las plantaciones muestreadas, no se observaron diferencias ni en cuanto al número de -

colonias, ni en cuanto a su diámetro de crecimiento, al ser comparados aislamientos provenientes de campos tratados a igual dosis, y de no tratados situados en zonas alejadas.

La mayor frecuencia de razas tolerantes se observó en los aislamientos provenientes de campos tratados a la mayor dosis de Benlate de 0,1% .

El hecho de resistencia de fenómenos de tolerancia al Benomyl en el ámbito de las poblaciones de P. tracheiphila, puede significar la futura ineficacia de eventuales tratamientos con fungicidas benzimidazólicos. Por otra parte, cabe considerar, aunque como posibilidad mas bien difícil de verificarse, que el Benomyl u otro fungicida benzimidazólico, podría frenar el desarrollo de las poblaciones de hongos saprófitos antagonistas efectivos del patógeno causante del "mal secco", agravando la enfermedad.

## CONCLUSIONES

de los aceites en el comportamiento sistémico de los productos aplicados en tratamiento foliar , se observó una mayor eficacia con el aceite de menor densidad ( 20 ° E. ) , que aumentó el acúmulo del Benomyl ( máximo a 15 días del tratamiento ) , así como el del Thiocur ( mayor acúmulo a 35 días del tratamiento ) . El aceite de mayor viscosidad ( 268 ° E. ) confirió al Thiocur buen acúmulo ( máximo a 20 días del tratamiento ) . En términos generales se puede decir , que el aceite de 20 ° E . , aumentó el acúmulo del Benomyl y la persistencia del Thiocur . La Triforina fué mas sistémica suministrada sin aceites .

- En los ensayos de control de la enfermedad , cuando los productos fueron aplicados en suspensión acuosa y suministrados en tratamiento foliar , se observó que los tres productos redujeron la intensidad media de los síntomas respecto a los presentados por los testigos no tratados , en los tratamientos efectuados antes de inocular el P. tracheiphila a los plantones . De las dos fechas de tratamiento ensayadas antes de la inoculación : 5 y 20 días , fué ligeramente mas efectiva la fecha de 5 días antes .

La reducción de síntomas obtenida , si bien no alcanzó en todos los casos la significatividad estadística , permitió observar una mayor eficacia del Benomyl y en segundo lugar del Thiocur .

- En los ensayos de control en que los productos eran suministrados en suspensión acuosa y aplicados en tratamiento al terreno , se observó, que el Benomyl y Thiocur mostraron una reducción de síntomas de la enfermedad respecto a los mostrados por los testigos no tratados estadísticamente significativa , especialmente en los tratamientos efectuados antes de la inoculación del patógeno . La Triforina no fué prácticamente efectiva .
- Los ensayos de control relativos a la acción de aceites auxiliares sobre la actividad de los productos , mostraron que el Benomyl y el Thiocur , redujeron la intensidad media de los síntomas de la enfermedad , de modo estadísticamente significativo , especialmente cuando fueron suministrados con la adicción del aceite de menor viscosidad (20 º E.).
- Los ensayos biológicos de sistemicidad de los fungicidas confirmaron los resultados obtenidos en las pruebas de control de la enfermedad .

- La existencia de cepas tolerantes al Benomyl tanto en campos tratados como no tratados indica la existencia de una tolerancia natural a este producto en las poblaciones del P. tracheiphila.
- La existencia de un mayor número de cepas tolerantes al Benomyl en campos tratados que no tratados, denota el hecho de una acción selectiva por parte del producto sobre las cepas del hongo
- Se encontró mayor frecuencia de cepas tolerantes al Benomyl en los campos tratados a mayor dosis (0,1 %)
- No se observaron influencias en la tolerancia de las cepas al Benomyl, debidas a diferencias de factores ecológicos entre las plantaciones de que provenían.
- El Benomyl actuó mayor número de veces como fungistático que como fungicida en las cepas sensibles de campos tratados, ocurriendo inversamente con las de campos no tratados.
- Se indica la posible ineficacia en el futuro de tratamientos con Benomyl, dada la aparición de cepas tolerantes, y se sugiere la eficacia de alternar las aplicaciones de este producto con otro de diferente principio activo.

*It*

RESUMEN



Se ensayó "in vitro" e "in vivo" la actividad de la Triforina y Thiocur en comparación con la del Benomyl frente al P. tracheiphila (Petri) Kanc. et Ghik, agente del "mal secco" de los --- Agrios. En las pruebas de control de la enfermedad tanto en tratamiento foliar como al terreno mostró buena actividad el Thiocur, aunque sin alcanzar el grado de efectividad obtenido con el Benomyl. La Triforina solamente presentó cierta reducción de los síntomas de la enfermedad en tratamiento foliar y aplicada a suspensión acuosa. Asimismo se observó mayor efectividad de control cuando los productos fueron aplicados antes de la inoculación del patógeno a los plántones, siendo de las dos fechas de aplicación efectuadas, respectivamente 5 y 20 días antes de la inoculación, ligeramente mas efectiva en tratamiento foliar la fecha de 5 días antes.

De igual forma se estudió la acción de 2 aceites minerales blancos de diferente viscosidad sobre la sistemicidad y actividad de control de los fungicidas en ensayo, aplicados en tratamiento foliar, observándose mas efectivo el aceite de menor viscosidad (20º E.)-- por aumentar el acúmulo del Benomyl y la persistencia del Thiocur.

Los ensayos biológicos de sistemicidad realizados paralelamente a las pruebas de control de la enfermedad, justificaron los resultados obtenidos en estas.

Por otra parte, con objeto de averiguar la acción del Benomyl sobre las poblaciones de P. tracheiphila en plantaciones de limoneros tratados con Benomyl durante 3 años consecutivos (al 1 % de Benlate), se comparó el comportamiento de cepas del patógeno provenientes de estos campos tratados con otras de campos nunca tratados, en una serie de pruebas "in vitro" en que el substrato fué adicionado de diversas concentraciones de Benomyl. De igual forma se intentó averiguar si las diversas dosis aplicada en campo y las diferencias ecológicas de las plantaciones muestreadas influían en la sensibilidad de las cepas.

A partir de las pruebas realizadas se pudo observar la presencia de cepas tolerantes tanto en campos tratados como no tratados, de lo que se dedujo la existencia de una tolerancia natural al Benomyl. El hecho de encontrarse mayor frecuencia de cepas tolerantes en campos tratados denota que la acción del fungicida incidió mas en la selección de las cepas que en la aparición del fenómeno de tolerancia.

No se observó influencia de los factores ecológicos en la sensibilidad de los aislamientos, influyendo por el contrario la mayor dosis de fungicida aplicada en campo por la mayor tolerancia presentada por las cepas aisladas en ellos.

## BIBLIOGRAFIA

ADRIANCE, G. W

- 1 950      The citrus Industry in Italy Calif. Citrog., 35: p. 318, 338, 341, 362, 378, 379.

AJON, G.

- 1.932 a    Aspetti chimici del "mal secco". Nouve ricerche. Riv. it. Ess. Prof. Piant., 14: 46 - 57
- 1.932 b    Le cure del "mal secco" degli agrumi. Real. Staz. sperim. Frutt. Agrum. Acireale, 10: 65 - 76
- 1.932 c    Il rapporto di equivalenza nelle specie agrumarie. Real. Staz. sperim. Frutt. Agrum. Acireale, 10: 81 - 94
- 1.932 d    Della biopatologia dell'albero di limone. Real Staz. sperim. Frutt. Agrum. Acireale, 10: 116 - 136
- 1.937 a    Aspetti chimici del "mal secco. Ann. Real. Staz. sperim. Frutt. Agrum. Acireale, 15: 5 - 39
- 1.937 b    Studi sul "mal secco" degli agrumi. Ann. Real. Staz. sperim. Frutt. Agrum. Acireale, 15: 95 - 114
- 1.940      Aspetti chimici del "mal secco". Real. Staz. sperim. Frutt. Agrum. Acireale, 8: 5 - 39
- 1.941      La vittoria sul "mal secco" degli agrumi. Riv. ital. Ess. Profum. Piant. off., 23: 2 - 3

AKHVLEDIANI, K.S.

- 1.958      Aislamiento de una substancia tóxica a partir de madera de limonero infectada por "mal secco" (en ruso) Soobshch. Akad. Nauk. Gruzin. S.S.R., Tbilissi, 21 89 - 90

- 1.966      Toxinas de los patógenos de las traqueomicosis y un estudio de las acciones de éstas en el "mal secco" de los cítricos, como ejemplo (en ruso). Moscow, Izdatel'stvo Nauka. Ir.: 42 - 56

ALOSI, S.

- 1.947      Agrumicoltura siciliana. Ricostituire i limoneti. Citrus, Messina, 19: 3 - 5

ANON.

- 1.943      Plant Pathology Notes. Intern. Bull. Plant Protect., Roma, 17: 1 - 2
- 1.946      Relazione sull'attività del laboratorio crittogamico dell'Osservatorio fitopatologico e del centro sugli anticrittogamici durante gli anni 1.944 e 1.945. Atti Ist. Botan. Univ. Pavia, Milano, 5: 279 - 321
- 1.951      Die italienischen Citruskulturen. Obst und Gemüse, Hamburg, Apr. 5: 26 - 28
- 1.969      Plant quarantine announcements. Pl. Prot. Bull F. A.O., 17: 95
- 1.971      Annali della Facoltà di Agraria, 32: 151 pp.

BALDACCI, E.

- 1.950      Caratteri culturali delle razze di Bakerophoma tracheiphila. Notiz. Mal. Piante, 9: 27 - 32

BALDACCI, E. e GAROFALO F.

- 1.948     Disseccamenti dei rami di mandarino (Citrus nobilis var. deliciosa) dovuti a Bacherophoma tracheiphila. Ric. sci., 18: 6
- 1.949     Disseccamenti dei rami di mandarino (Citrus nobilis var. deliciosa) dovuti a Bacherophoma tracheiphila. Ric. sci., 18: 625
- 1.950     Knowledge and researches relating to wither tip of Citrus trees. Foreing Agricul. Circul. Washington: 4 - 11

BATTIATO, C.

- 1.940     Osservazioni sul decorso del "mal secco" Deutero-phoma tracheiphila Petri in Citrus deliciosa Ten. var. King Hort ed in Citrus limonum x Citrus aurantium Risso. Riv. Pat. Veg., Pavia, 30: 139-144
- 1.948     Nuovi casi di "mal secco" in Citrus deliciosa Ten. Italia Agricola. Roma, 85: 341 - 342

BAZZI, B. and SCRIVANI, P.

- 1.954     Un método diagnostico per il riconoscim ento del decorso del "mal secco" degli agrumi. Phytopath. Zeits. Berlin, 21: 333 - 334

BEN AZIZ, A.

- 1.967     Nobiletin is main fungistat in tangerines resistant to "mal secco". Science, New York, 155: 1026-1027

BEN AZIZ, A., CHORIN, M., MONSELISE, S.P., and REICHERT, I.

- 1.962     Inhibitors of Deuterophoma tracheiphila in Citrus varieties resistant to "mal secco". Science, New York 135: 1066 - 1067

BEN-YEPHET, Y., HENIS, Y., and DINOOR, A.

- 1.974     Genetic studies on tolerance of carboxin and benomyl at the asexual phase of Ustilago hordei. Phytopathology, 64: 51 - 56

BIRAGHI, A.

- 1.935     Rilievi su alcuni Citrus a frutto acido presenti in India in relazione alla ricerca di forme resistenti al "mal secco". Boll. Real. Staz. Patol. Veget., Firenze, 15: 3

BOLLEN, G.J., and SCHOLTEN G.

- 1.971     Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of Botrytis cinerea in cyclamen. Neth. J. Plant Pathol., 77: 83 - 90

BOOTH, C., HOLLIDAY, P., O'ROURKE, C., FUNITHALINGAM, E. and WALLER, J.M.

- 1.973     CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria Set 40: 391 - 400

BUGIANI, A., SCRIVANI, P. and LOPRIENO, N.

- 1.959     Indagini sul parasitismo da Deuterophoma trachei-

phila Petri. Società Montecatini, Milano 24 p.

BURKE, J.H.

- 1.951 A study of the Citrus industry of Italy. Foreign Agric Report, Washington 59 : 121

CALABRESE, F.

- 1.968 Per l'agrumicoltura italiana. Vecchi e nuovi portinnesti. Italia agricola, Roma 105 : 605 -622

CARRANTE, V.

- 1.938 Il "mal secco" del limone e i mezzi di lotta più consigliabili allo stato attuale delle conoscenze. Boll. Real. Staz. sperim. Frutt. Agrum., Acireale: 1-32

CARRANTE, V. e BOTTARI, V.

- 1.952 Miglioramento genetico del limone e ricerca di varietà resistenti al "mal secco". Ann. sperim. Agrar. Roma, 6 : 323 - 346

CARRANTE, V., e RUGGIERI, G.

- 1.946 Piano di studi e ricerche sul "mal secco" et sul marciume radicale degli agrumi. Citrus, Messina, 18 5 - 8
- 1.947 Esperienze di inoculazione della Deuterophoma tracheiphila Petri. Staz. sperim. Frutt. Agrum. Aci-

reale, public. 4 : 83 - 91

CASELLA, D.

- 1.935 Le malattie degli agrumi e lo stato attuale dei rime di relativi. Ann. Real Staz. sperim. Frutt. Agrum Acireale, 13 : 239 - 253
- 1.936 Il "mal secco" degli agrumi. Strani commenti. Ci-trus Messina, 22 : 17 - 19

CATARA, A. e CÙTULI, G.

- 1.972 Osservazioni sulla suscettibilità di alcune rutacee alle infezioni epigee di Phoma tracheiphila. Es-tratto degli Annali dell'Istituto Sperimentale Per L'Agrumicoltura, 5.

CATARA, A., LONGO, M., and CARTIA, G.

- 1.972 Growth of Phoma tracheiphila on culture media in relation to fungistatic phenolic compounds in exocor-tis infected sour orange seedlings. Proc. 6th. Conf. Inter. organization Citrus Virol.

CATARA, A., LONGO, M., GINOPRELLI, B. e SCARAMUZZI, G.

- 1.973 Ricerche sull'attività fungistatica di estratti di arancio amaro di C. volkameriana nei confronti di P. tracheiphila. Rivista di Patologia Vegetale, 9:139-152

CATARA, A., TODARO, M. e SCARAMUZZI, G.

- 1.971 Decorso del "mal secco" e comportamento di P. tra-cheiphila su estratti agarizzati in rapporto alle varia



zioni del contenuto fenolico in semenzali di arancio amaro affetti da "variegatura infettiva". Riv. Patol. Veg., Pavia, Ser. 4 : 227 - 238

CHAPOT, H.

- 1.963    Le "mal secco". Al Awamia (Rev. Rech. Agron. Maroc), 9 : 89 - 125
- 1.965    Le Citrus volkameriana Pasquale. Al Awamia (Rev. Rech. Agron. Maroc), 14 : 29 - 45
- 1.972    "Mal secco" of citrus. In Proceeding of the 12th -- Science. Week, Supreme Council of Sciences, 5 : 13 - 31

CHAPOT, H. et BACHECECIUGLU, H.

- 1.969    Some lemon culture troubles in Turkey. Proc. 1st. int. Citrus Symp. Riverside, 1,968, 3 : 1279-1283

CHAPOT, H., et DELUCCHI, V.L.

- 1.963    Les ennemis des agrumes au Maroc, Rabat,

CHORIN, M., and PINKAS, J.

- 1.970    The "mal secco" and blast diseases of Lemon and other Citrus species. The Volcani Institute of Agricultural Research. Summaries of Research Work 1.967 - 1.969. Division of Plant Ontology. 38 pp.

CICCARONE, A.

- 1.971 Il fungo del "mal secco" degli Agrumi. Phytopath. Mediterranea 10 . 68 - 75

CICCARONE, A., and RUSSO, M.

- 1.969 First contribution to the systematics and morphology of the causal agent of the "mal secco" disease of Citrus (Deuterophoma tracheiphila Petri) Proc. First Inter. Citrus Symposium, 3 : 1239 - 1349

DE CICCO, V., e LUISI, N.

- 1.975 Influenza degli oli sull'attività del Benomyl, del Me tiltiofanato e di alcuni derivati contro il "mal secco" degli Agrumi. Atti Giornate Fitopatologiche, 392-400

CIFERRI, R.

- 1.946 La posizione sistematica del fungo del "mal secco" del limone (Bakerophoma tracheiphila Petri). Atti Ist. Botan. Univ. Pav., Milano, Lab. critt., Ser. 5 : 307 - 309

CRESCIMANNO, F.G. , e SACCO, S.

- 1.955 Ricerche su alcune cultivar siciliane di limone. Riv. Ortoflorofrutticoltura. ital. Firenze, 3-4: 137 - 147

CRESCIMANNO F.G. , SOMMA, V. , e CALABRESE, F.

- 1.973 Preliminari research on resistance of some root--stocks to "mal secco". Atti.: I Congreso Mundial de

citricultura, España, 1 973 , 2 .

CROSSA-RAYNAUD, P.

- 1.960 a Problèmes d'arboriculture fruitière en Tunisie. Ann. Inst. nat. Recher. agronom. Tunisie, 33: 109 - 112
- 1.960 b Le "mal secco". Vign. Jard. et Verg. de Tunisie, Tunis, 20 : 6 - 10

CUTULI, G.

- 1.972 Il "mal nero": Una particolare forma di "mal secco" . Phoma(Deuterophoma) tracheiphila (Petri) Kanc. et Ghik. osservata su specie diverse di agrumi. Annali dell'Istituto Sperimentale per L'agromicoltura 5

CUTULI, G., e SALERNO, M.

- 1.976 Il "mal secco" degli Agrumi. Terra viva, 8 : 3 - 13

DAMIGELLA P., e CONTINELLA, G.

- 1.971 Il miglioramento genetico del limone. Osservazioni comparative su alcune selezioni clonali. Tecnica -- Agric., Catania, 23 : 684 - 744

DANELIJA, B.K.

- 1.968 The effect of some ecological factors on the survival of the fungal causal agent of "mal secco" of citrus, P. tracheiphila. Subtrop. Kul'tury, 5 : 34 - 42

DARASELIA, N.A.

- 1.953      Presencia en el suelo de bacterias anatagonistas de P. tracheiphila agente causal del "mal secco" ( en ruso). Microbiologie, Moscou, 22 : 203 - 205

DAVINO, M., CATARA, R., PERROTA, G. e GRASSO, S.

- 1.974      Variazioni del contenuto in fenoli liberi in piante di agrumi inoculate con P. tracheiphila. Rivista di Patologia Vegetale, 4 : 123 - 136

DEMETRADZE, T. YA, BAKANIDZE, M. SH., and TAVDUMADZE E.

- 1.972      The carbohydratenitrogen metabolism in the leaves of different citrus species and varieties in relation to "mal secco" and frost-resistance. Subtropicheskie Kul'tury, 2 : 70 - 73

DEMETRADZE, T. YA, and DZANELIDZE, M.T.

- 1.970      Studies of some physiological and biochemical indices in lemon trees in connection with "mal secco" disease Subtrop. Kul'tury, 4 : 94 - 100

DEMETRADZE, T. Ya, GOLIADZE, SH.K. and ADEISHVILI, N.I.

- 1.970      Water circulation in plants with "mal secco" disease Subtrop. Kul't 2 : 90 - 95

DONADZE, V.Z.

- 1.966      On the study of resistance to dessication ("mal secco")

in different varieties and forms of citrus. Trudy Inst. bi Zashchity Rast. gruz. SSR, 18 : 209 - 216

- 1.969 Wilt resistance in lemon. Trudy Instituta zashchity Gruz. SSR, 21 : 22 - 27
- 1.970 The effect of mixed planting of citrus trees on the symptoms of "mal secco" in lemons. Trudy Instituta Zashchity Rastanii Gruzinskoi SSR, 22 : 160-163

DZHANELIDZE, V.S and RAZMADZE, E.G.

- 1.960 First results of government variety trials of lemons Sadovodstvo, 10 : 27 - 30

DZHANELIDZE, M.F. e TSANAVA, N.G.

- 1.972 The changes in free amino acids in the leaves of different lemon cvs in relation to "mal secco" infection Subtropicheskie Kul'tury. 6 : 78 - 81

DZNELADZE, A.A.

- 1.974 Activity and fluorescence spectra of a pure culture of the plant pathogen P. tracheiphila. Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi SSR 76 : 697 - 700

EGOROVA, G.N.

- 1.958 Las características específicas de las variedades de agrios resistentes al Deuterophoma tracheiphila Petri (en ruso). Inst. Biokhim. im. A.N. Bakha. Sbornik., Moscou, 4 : 112 - 117

ELIA, M.

- 1.969 Brevi note preliminari su tentativi di lotta endoterpica del "mal secco" degli agrumi. Inflore fitopatol. 19 : 403 - 404,

ERCEGOVICH, C.G., WUEST, P.J., and COLE, J.K.H.

- 1.973 Further information on controlling "Verticillium" disease of mushrooms and the benomyl residue associated with control treatments. Mush. News, 21 : 5 - 9

ERWIN, D.C., KHAN, R.A, and BUCHENAUER, H.

- 1.974 Effect of oil emulsion on the uptake of benomyl and thiabendazole in relation to control of "Verticillium" wilt of cotton. Phytopathology, 64 : 485 - 489

ERWIN, D.C., MEE, H. and SIMS, J.J.

- 1.968 The systemic effect of 1-(butylcarbamoil)-2-benzimidazole carbamic acid, methyl ester, on "Verticillium" wilt of Cotton, Phytopathology, 58 : 528 - 529

EVOLA, C., ROSCIGLIONE, B., e SALERNO, M.

- 1.973 Attività pectinolitica, cellulolitica e  $\beta$ -glucosidasi di Phoma (Deut) tracheiphila (Petri) Kanc. et Ghik. Phytopathologia Mediterranea 12 : 36 - 42

FATTA DEL BOSCO, G.

- 1.963 Mutations strains and chimaeras in the lemon groves

of the Palermo area. Frutticoltura 25 : 313 - 317

FAWCETT, H.S.

- 1.936 Citrus diseases and their control. New York: 308-314

FEDORINTCHIK, N.S

- 1.953 a Las particularidades de los síntomas y evolución de la enfermedad en cítricos contaminados por Deuterophoma tracheiphila Petri (en ruso). Comptes-rendus Acad. Lenine Sci. Agric., 18, Moscou, 6 : 23 - 26
- 1.953 b Es preciso luchar contra el desecamiento infeccioso del "mal secco" de los cítricos (en ruso) Verqer et Potager, Moscou 8 : 21 - 23
- 1.953 c Control de la enfermedad del "mal secco" de los cítricos (en ruso). Sad. i Ogorod, 8 : 21 - 23
- 1.961 Do not neglect "mal secco". Zasc.Rast.Vred Bolez. 6 (5) : 51 - 52

FODDAI, A. and MARRAS, F.

- 1.963 Contributi alla patologia degli Agrumi coltivati in Sardegna. II. Segnalazione del "mal secco" degli Agrumi in Sardegna. Fitopat.Sard. 5 : 12

FUCHS, A., DOMA, S., and VÖRÖS, J.

- 1.971 Laboratory and greenhouse evaluation of a new systemic fungicide CELA W 524. Neth. J.Path. 77: 42 -54

FUCHS, A., VIETS-VERWEIJ, M., VOROS, J. and VRIES, F.W.

- 1.970 Some observations on activity and metabolism of a new systemic fungicide, CELA W 524. Proc. Conf. biochem. ecol. Aspects Plant-Parasite Relations, Budapest, Hungary

GANDALINO, B.

- 1.952 L'andamento della coltura del bergamotto nel primo semestre del 1.952. Boll.uff.Staz.sperim.Agrar., 22 : 31 - 33

GASSNER, G.

- 1.940 Untersuchungen über das "mal secco" oder "Kurutan" der Limonbäume. Phytophath. Zeitschrift, Berlin, 13 : 90 p.

GIKASHVILI, K.G.

- 1.968 Study of the mechanism of action of Phoma tracheiphila causing Lemon wilt from infected fruits. Proceedings of the Thrid Transcaucasian Conference on sporebearing plants. Tbilisi, Inst.Bot.Acad.Sci.Georgian SSR.

GOIDANICH, G.

- 1.949 Malattie dei fruttiferi. Le tracheomicosi. Italia Agricola, Roma, 86 : 637 - 640
- 1.964 Manuale di patologia vegetale. Edizioni agricole, Bologna, 2 : 902 - 911



GOIDANICH, G. e RUGGIERI, G.

- 1.947 a Una rapida riproduzione sperimentale del "mal secco" degli agrumi. Ann. sperim. Agrar., Roma, 1 : 141 - 145.
- 1.947 b Le Deuterophomaceae di Petri. Ann. sperim. Agrar. Roma, 1 : 431 - 448
- 1.947 c Il carattere della resistenza dei Citrus al parasitismo della Deuterophoma tracheiphila Petri. Ann. sperim. Agrar., Roma, 1 : 473 - 484
- 1.948 Recenti osservazioni sulla biologia della Deuterophoma tracheiphila, riconsiderazioni sull'eziologia del "mal secco" degli agrumi. R.C. Accad. dei Lincei Roma, 8 : 395 - 402
- 1.949 Effetti del freddo e "mal secco" negli agrumeti siciliani. Ann. sperim. Agrar. Roma 3. 2. : 391 - 397
- 1.953 Il "mal secco" degli agrumi. Giorn. Agric., Roma, 3 : 14

GOIDANICH, G., RUGGIERI, G., e GAGNOTTO, A.

- 1.948 Presenza di una terza forma di moltiplicazione agamica in Deuterophoma tracheiphila Petri Ann. sperim. Agrar., Roma, 2 : 671 - 675

GOLDBERG, A. and COLE, H.

- 1.973 In vitro study of Benomyl tolerance exhibited by Sclerotinia homoeocarpa. Phytopathology, 63 : 201 - 202

GOLIADZE, G.P.

- 1.960 The effect of phytoncides from some Lemon varieties

on the fungus causing "mal secco" disease. Subtrop. Kul't, 3 : 63 - 66

GOLIADZE, S.K.

- 1.957 Métodos para la determinación de resistencia en cítricos al "mal secco" (en ruso). Byull. vses. nauchno-issled. Inst. Chaya. Subtrop. Cult. 1 : 158 - 179
- 1.970 A method of preliminary grading of lemon seedlings for "mal secco" resistance. Subtrop. Kul'tury 3:38-42
- 1.972 a The phytoncidal activity of lemon trees. Subtrop. -- Kul'tury, 3 : 49 - 53
- 1.972 b Selection of lemon for "mal secco" resistance. Subtrop. Kul'tury 4 : 56 - 63
- 1.972 c Obtaining resistant lemons by hybridization. Subtrop. Kul'tury, 5 : 108 - 114

GOLIADZE, S.K., KASHAKASHVILI, T.S, and TIKANADZE, L.N

- 1.972 The genetic relation-ship of the lemon tree with the "mal secco" causal fungus. Part. L. Subtrop. Kul'tury, 2 : 97 - 100

GOLIADZE, S.K., and KERKADZE, I.K

- 1.971 Cytoanatomical resistance to "mal secco". Subtrop. Kul'tury, 4 : 76 - 80

GOLIADZE, S.K. and TIKANADZE, L.N.

- 1.969 The development of acquired immunity in lemons. Subtrop. Kul't. 6 : 32 - 40

- 1.972 The effect of chemicals mutagens on the resistance of lemon trees to "mal secco". Subtrop. Kul'tury, 6 : 68 - 72

GORLENKO, M. V.,

- 1.963 Changes in the composition of the parasitic flora of a number of cultivated plants in the Soviet Union. Biol. Sci., 2 : 115 - 120

GRANITI, A.

- 1.955 Morfologia di Deuterophoma tracheiphila Petri e considerazioni sul genera Deuterophoma Petri. Boll. Accad. Gioenia Scien. Natur., Catania, 67 : 93
- 1.962 Casi di "mal secco" degli agrumi in Puglia. Giornale di Agricoltura, N. 43 - 28
- 1.963 Picnidi di D. tracheiphila Petri su organi fogliari. Phytopath. medit., 2 : 95
- 1.969 Host-parasite relations in citrus diseases as exemplified by Phytophthora gummosis and Deuterophoma "mal secco". Proceeding first international citrus symposium. 3 : 1187 - 1200

GRASSO, S.

- 1.973 Infezioni di P. tracheiphila su climentine, riscontrate in Sicilia. Tecnica Agricola, 25 : 5 - 10

GRASSO, S., PACETTO, M., e PERROTA, G.

- 1.970 Effeto inibitorio del filtrato di volta di D. tracheiphila Petri sul virus della "variegatura infettiva" degli agrumi. Riv. Patol. veg., Pavia Serv. 6 : 219 - 230

GRASSO, S. e PACETTO, M.

- 1.971 Infezioni di Phoma tracheiphila su piante di Mandarino, osservate in Sicilia. Riv. Patol. veg., Pavia Ser. 7 : 239 - 248

HARDING, P.R., JR.

- 1.972 Differential sensitivity to thiabendazole by strains of Penicillium italicum and P. digitatum. Plant. Dis. Repr., 56 : 256 - 260

HOHRYAKOV, M.K.

- 1.952 Specificity of the causal agent of infectious desiccation of lemon trees (Deuterophoma tracheiphila Petri) Microbiology, Moscou, 21, 2, 210, 218

HOLMES, J.H., COLE, JR. and WUEST, P.J.

- 1.971 Control of the Verticillium disease of the cultivated mushroom, Agaricus bisporus, with benomyl spray applications to cased trays. Plant. Dis. Rep. 55:684-687

HUROSVILI, K.G.

- 1.958 Cultivation of isolated embryos and tissues as a method of citrus breeding. Bull. Veses. n-i In-ta Caja i subtrop. Kul'tury, 1 : 178 - 197

JAMESON, J.G.

- 1.950     Lemon growing in Sicily. Calif. Citroq. Los Angeles, 35 : 122 - 124

KALICHAVA, G.S. and DZENELADZE, A.A.

- 1.973     Spectral characteristics of leaf fluorescence intensity in normal state and pathology. Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Raatenii Gruz SSR 25 : 135 - 138

KALICHAVA, G.S., DZENELADZE, A.A., MATESHVILI, R.G.  
LAPTEV, B.M., KOROLLI, L.L, and GVAKHARIYA, T.A.

- 1.974     Role of iron manganese and SH-groups in healthy and diseased plant tissues. Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi SSR, 76 : 169 - 172

KANCHAVELI, L.A, GEGENAVA, G.V, NISHNIANIDZE, N.O, SEI  
NISHVILI, O.N., and GOGIBERIDZE, G.S.

- 1.973     On the question of using inhibitors of plant growth -- against "mal secco" of citrus plants. Trudy Nauchno Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Gruz. SSR. 24 58 - 60

KANCHAVELI, L.A. and KALICHAVA, G.S.

- 1.971     Interrelation between photosynthetic activity and plant cell disease. Soobshch. Akad. Nauk.gruz SSR . 64 469 - 472

KANCHAVELI, L.A., KALICHAVA, G.S., and KIKVADZE, N.A

- 1.973 Study on healthy and "mal secco" affected leaves of lemon by electron paramagnetic resonance. Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Raastenii Gruz SSR, 24 : 269 - 273

KANCHAVELI, L.A., and GIKACHVILI, K.G

- 1.948 Materiales para el estudio del "mal secco" o desecamiento de limoneros en Georgia SSR. Trudy Inst. -- Zashch. Rast., Tbilisi 5

KASHAKASHVILI, T.S.

- 1.972 The "mal secco" resistance of lemons of zygotic and nucellar origin. Subtrop. Kul'tury, 4 : 101 - 105

KIKACEJSVILI, A.N.

- 1.958 The effect of some chemical elements on the anatomical structure of lemon and its susceptibility to "mal secco". Tr.In-ta Zasc.Rast. AN Cruz SSR, 12 : 137 - 152.

KIKACHEISHVILI, Z.N., KIKVADZE, N.A., GIORGADZE, R.G.

- 1.972 The effect of nutrition with organic iron compounds of the resistance of Novogruzinskii lemon to "mal secco" Tr.In-ta Zasc.Rast. Gruz. SSR, 22 : 192 - 196

KIYASHIKO, P.I.

- 1.951 On the toxic fungus Deuterophoma tracheiphila Petri

the causal agent of infections desiccation of lemon - trees ("mal secco"). Trudy vses. Inst. Zashch. Rast. 3 : 176 - 177

KLOTZ, L.J.

- 1.950 Dr. Klotz reports on Italian lemons. Calif. Citroq., Los Angeles, 36 : 74 - 75
- 1.953 "mal secco" and other diseases of Citrus in Italy. Calif. Citroq. Los Angeles, 39 : 3, 20, 22 - 23

KNORR, L.C.

- 1.965 Serious diseases of citrus foreing to Floria. Bull Fla Dep. Agric., 5 : 59

KNORR, L.C. and VAUGHN, J.R.

- 1.964 World Citrus problems. III. Syria. Pl Prot. Bull.FAO 12 : 37 - 41

KOLELISVILI, M.V

- 1.962 Results of hybridation in lemon. Agrobiologia, 5:709-715

KOVACS, A.

- 1.961 Prove di laboratorio con fungicidi contro Deuterophoma tracheiphila Petri. Phytopath.medit, 1 : 120-132

KOYEAS, V. and ANASTASSIADIS, B.

- 1.962 Dissemination of D. tracheiphila Petri by the common Magpie (Pica pica L.) Ann. Inst. Phytopath. Benaki, N.S., 4 : 52 - 55

KURAMOTO, T.

- 1.976 Resistencia to Benomyl and Thiophanate-methyl in strains of Penicillium digitatum and P. italicum in Japan, Plant Dis. Repr. 60 : 168 - 172

LABORDA, E. y SANCHEZ, A.

- 1.977 Estudio experimental de la patogenicidad del P. tracheiphila (P.) Kanc. et Ghic. ("mal secco") en diferentes variedades de cítricos. Congreso de citricultura 1.973, 2 : 615 - 618

LAKHOUA, H., et al.

- 1.966 Laboratoire d'Arboriculture Fruitière, Rapport d'Activités, Année 1.966. Institu National de la Recherche Agronomique de Tunisie : 33

LANZA, G.

- 1.972 Occasionale presenza di Phoma macrostoma su arancio cv. "Tarocco" affetto da "mal nero" (Phoma (D.) tracheiphila (Petri) Kanc et Ghic). Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Agricoltura, 5 : 5



LICCIARDELLO, G.

- 1.958 Il punto isometabolico di D.tracheiphila Petri agente del "mal secco" degli agrumi. Ann. sperim. Agrar., Roma, 12 : 913 - 924

LITTRELL, R.H.

- 1.974 Tolerance of Cercospora arachidicola to benomyl and related fungicides. Phytopathol., 64 : 1377 - 1378

LUISI, N.

- 1.977 Prodotti sistemici in Patologia vegetale, ecologia e adattamento dei patógeni, Securitas; (en prensa)

LUISI, N., DE CICCIO, V., e SALERNO, M.

- 1.976 Attività dei fungicidi benzimidazolici contro il "mal secco" degli Agrumi. Inf.tore Fitopatol., 6 : 19 - 24

MACKENZIE, D.R.

- 1.970 Genetics of fungicide tolerance in a natural population of the plant pathogen Cochliobolus carbonum Nelson. Ph. D. Thesis, The Pennsylvania State University; 60p

MACKENZIE, D.R., COLE, H. JR and NELSON R.R.

- 1.971 Qualitative inheritance of fungicide tolerance in a natural population of Cochliobolus carbonum. Phytopathology, 61 : 458 - 462

- 1.972 Epidemiology of monorganic fungicide tolerance with the plant pathogen Cochliobolus carbonum. Plant Dis. Rep., 56 : 164 - 167

MATTEI, G.E.

- 1.929 Il "mal secco" negli agrumi del Messinese. Riv. ital. Ess. e Prof., Ott., Milano : 273 - 275

MAURO, E.

- 1.934 Proposte e rimedi sul "mal secco". Il Popolo di Sicilia. Agos. 24

METLITSKII, L.V.

- 1.966 Biochemical principles of plant protection. Biochemistry of the immunity of plants and crop storage. Moscow, Izdatel'stvo Nauka Ir. : 232 pp.

MKERVERALI, V.G. and DZIMISTARISHVILI, N.D.

- 1.971 Trials with antibiotics and chemical preparation against the pathogen of "mal secco". Subtrop. Kul'tury, 1 : 160 - 164

NACAIDZE, I.A. and TALAKVADZE, K.B

- 1.958 Influencia de las sustancias de crecimiento sobre la sensibilidad de los limoneros al "mal secco" (en ruso) Bull. Inst. Thé et Cult. subtrop. Makharadze. 1:11-114

NACHMIAS, A., BARASH, I. SOLEL, Z. and STROBEL, G.A

- 1.977 a Purification and characterization of a phytotoxin produced by P. tracheiphila, the causal agent of "mal secco" disease of citrus. Physiological Plant Pathology, 10 : 147 - 157
- 1.977 b Translocation of "mal secco" toxin in lemons and its effect on electrolyte leakage, transpiration, and citrus callus growth. Phytoparasitica, 5 : 104 - 108

NEHRU, S.S

- 1.931 L'applicazione delle onde elettromagnetiche sulla cura del "mal secco" degli agrumi. Citrus Messina, p. 291.

NESTERENKO, G.A

- 1.954 La lucha contra la enfermedad del "mal secco" de los agrios (en ruso). Verger et Potager. Moscou, 4:49-50

ORCHANSKAYA, V.N.

- 1.952 Algunos resultados de un estudio de cultivos de D. tracheiphila Petri, y algunos aspectos de su aplicación al tratamiento del "mal secco" de los agrios (en ruso) Bull Acad. Scien. URSS. Moscou, 1 : 89 - 100
- 1.953 Descubrimiento y aplicación de métodos de diagnóstico precoz del "mal secco" de los limoneros para el control de injertos (en ruso). Isvest. Akad. Nauk. URSS. ser biol., 6 : 90 - 97
- 1.955 Sobre la diagnosis del "mal secco" de los agrios (en ruso). Verger et Potager. Moscou, 3 : 78

- 1.960 Tratamiento de semillas con toxinas de hongos fitopatógenos como método para seleccionar plantas resistentes a enfermedades causadas por hongos (en ruso) Agrobiologiya, 4 : 573 - 578

ORCHANSKAYA, V.N. and ORJONIKIDZI, N.P.

- 1.956 Método acelerado de laboratorio para probar la resistencia de los agrios al "mal secco" (en ruso). Agrobiol., 5 : 35 - 44

PACETTO, M. and GRASSO, S.

- 1.969 Influence of treatments with naphthalene-acetic acid (NAA) and polyphenoloxidase activity in Citrus seedlings with respect to "mal secco" (D. tracheiphila) Notiz. Mal Piant. Ser. III, 7 - 8 : 85 - 92

PACULIJA, K.F.

- 1.959 The significance of the texture of lemon wood in relation to the entry and development of the fungus pathogen of "mal secco". Subtrop. Kul'tury, 2 : 40 - 43.

PASINETTI, L.

- 1.952 Sulle vere cause determinanti il "mal secco" degli agrumi e su nuovi orientamenti terapeutici. Ann. Fitopat., Palermo, 1 : 1 - 67

PATCHOULIA, E.F.

- 1.959 Significado de la estructura de madera de limonero en relación a la penetración y desarrollo en la planta del "mal secco" (en ruso). Bull. Instit. Recher. Trop., 2:40-43

PERROTA, G., PACETTO, M. and TIRRO, A.

- 1.969 Activity of new systemic products (benlate thiabendazol, and vitavax) tested 'in vitro' and 'in vivo' against *D. tracheiphila* Petri. Atti del XIX Convegno della S.I.F. Milano, 9 Ottobre 1969.

PETRI, L.

- 1.926 a Ricerche sulle cause del disseccamento dei limoni in provincia di Messina. Boll. Real Staz. Pat. Veg. Firenze, 6 : 108 - 117
- 1.926 b Ulteriori osservazioni sul disseccamento dei limoni in provincia di Messina. Boll. Real. Staz. Pat. Veg. Firenze, 6 : 200 - 202
- 1.927 a Effetti del solfato di manganese sulle piante di limone attaccate dal *Colletotrichum gloeosporioides* Penz Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 7 : 213 - 214
- 1.927 b Ricerche sulle cause del "mal secco" dei limoni in provincia di Messina et sui mezzi per combatterlo. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 7 : 229 - 284
- 1.928 Il "mal secco" dei limoni in rapporto all'incoltura. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 8 : 216 - 221
- 1.929 a Batteriosi dei rametti e "mal secco" dei limoni in Sicilia. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 9 : 282-290
- 1.929 b Sulla posizione sistematica del fungo parassita delle piante di limone affette da "mal secco". Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 9 : 393 - 396
- 1.930 a Note pratiche per ostacolare il diffondersi del "mal secco" degli agrumi. Giorn Agr. merid., Messina, 208.
- 1.930 b Ulteriori ricerche sulla morfologia, biologia e parassitismo della *D. tracheiphila*. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 10 : 191 - 221

- 1.930 c Risultati di alcune ricerche sperimentale sopra il "mal secco" degli agrumi. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 10 : 353 - 359
- 1.930 d Nuove osservazioni sulla biologia della D. tracheiphila. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 10 437 - 447
- 1.930 e Lo stato attuale delle ricerche sul "mal secco" dei limoni. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 10-11: 63-107
- 1.930 f La riproduzione sperimentale del "mal secco" dei limoni. Atti Real. Accad. Naz. dei Lincei, Roma Ser. 6, 11 : 146 - 149
- 1.932 a La lotta contro il "mal secco" dei limoni Citrus Messina, ser. 2. 18 : 268 - 271
- 1.932 b L'applicazione della terapia interna contro il "mal secco" dei limoni. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 12 : 236 - 237
- 1.934 a La lotta cotro il "mal secco" e la ricostruzione dei limoneti. Citrus Messina, 10 : 232
- 1.934 b Alcune considerazioni sopra i generi Deuterophoma e Blastophoma. Phytopath. Zeitschrift. Berlin, 7 117 - 119
- 1.935 Rassegna dei casi fitopatologici osservati nel 1.934. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 15 : 47 - 55
- 1.936 a Rassegna dei casi fitopatologici osservati nel 1.935. Boll. Real. Staz. Pat. Veg. Firenze, 16 : 1 - 25
- 1.936 b Ricerche sulle cause del disseccamento dei limoni in provincia di Messina. Boll. Staz. Pat. Veg. Roma, 16
- 1.940 Recenti ricerche sul "mal secco" degli agrumi in Turchia. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 20

PIATELLI, M. and IMPELLIZZERI, G.

- 1.971 Fungistatic flavones in the leaves of Citrus species resistant and susceptible to D. tracheiphila. Phytochemistry, 10 : 2657 - 2659

PINKAS, J., LAVIE, D. and CHORIN, M.

- 1.968 Fungistatic constituents in citrus varieties resistant to the "mal secco" disease. Phytochemistry, 7 : 169 - 174

PIRTSKHALAISHVILI, M.N., MAKASHVILI, G.A. and LOMTADZE, N.A.

- 1.969 Amino acid composition of cell walls of the phytopathogenic fungus D. tracheiphila. Soobshch. Akad. Nauk. gruz. SSR., 53 : 453 - 456

POLIAKOV, I.M. and SHUMAKOVA, A.A.

- 1.951 Una investigación sobre las propiedades tóxicas del hongo de D. tracheiphila Petri (en ruso) Trudy vses. Inst. Zashch. Rast. 3 : 165 - 171
- 1.954 Acumulación de toxinas durante el desarrollo del hongo D. tracheiphila Petri en diferentes condiciones. (en ruso). Acad. Lenine Sci. Agric., Moscou, 19: 43 - 48

PUNITHALINGAM, E. e HOLLIDAY, P.

- 1.973 D. tracheiphila, "CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria," n.399

QUILICO, A., CARDANI, C., PIOZZI, F. e SCRIBANI, P.

- 1.952 I pigmenti del D. tracheiphila. Atti Accad. Naz. dei Lincei. Roma. ser. VIII, 12 : 650 - 657

RABINOVITZ - SERENI, D.

- 1.931 a Azione stimulante del biossido di carbonio sulla germinazione delle spore di D. tracheiphila. Boll. Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 11 : 143 - 152.
- 1.931 b Perdita della facoltà germinativa delle spore di D. tracheiphila alla fine del periodo primaverile. Boll. Real Staz. Pat. Veg., Firenze, 11 : 154 - 157
- 1.931 c Sulla presenza degli stomati sull'epidermide della pagina superiore delle foglie di varie specie di Citrus Boll. Real Staz. Pat. Veg. Firenze, 11 : 164 - 170

RACITI, G.

- 1.956 Analisi di foglie di limone trattate con anticrittogamici rameici. Riv. Agrumicol. Acireale, 1 : 369-370

REBOUR, H.

- 1.950 L'agrumiculture italienne. Rev. Hortie., Algerie. Alger., 54 : 168 - 171

REICHERT, I. and CHORIN, M.

- 1.956 "Mal secco" of Citrus in Israel and neighbouring Countries. Bull. Res. Counc. Israël, Jerusalem. sec. Bot., 5 - D., 2 - 3 : 176 - 180



REICHERT, I. and FAWCETT, H.S.

- 1.930 Citrus diseases new to Palestine. Phytopathology,  
20 : 1003

ROMANO, A.

- 1.957 Sul possibile impiego dell'antibiotico griseofulvina  
contro l'agente del "mal secco" degli agrumi (D. tra-  
cheiphila Petri.) Not. Mal. Piante, 40, 41 : 132-136

RUGGIERI, G.

- 1.931 a Sulla presunta influenza di certi terreni nel rendere  
resistenti al "mal secco" le piante di limone. Boll.  
Real. Staz. Pat. Veg., Firenze, 11 : 170 - 171
- 1.931 b Note tecniche sul "mal secco" degli agrumi. Citrus  
Messina, 17 : 91 - 95
- 1.936 a Riscoperta sul "mal secco" degli agrumi. Citrus Me-  
ssina, 22 : 1 - 2
- 1.936 b Limiti di competenza in materia di patologia degli agru  
mi. Citrus Messina, 22 : 96 - 100
- 1.936 c Varietà di limoni resistenti al "mal secco". Giorn.  
Agric. Roma, 20 : 165
- 1.936 d Indagini sulla varietà di limone Monachello. Boll. Real  
Staz. Pat. Veg., Firenze, 17 : 293 - 304
- 1.937 Ricerche sull'affinità d'innesto del limone Monachello  
con altri Citrus. Boll. Real Staz. Pat. Veg. Firenze  
17 : 79 - 86
- 1.938 a Le applicazioni della genetica in agrumicoltura. Nuov.  
Ann. dell'Agric., Roma, 18 : 325 - 348

- 1.938 b Aspetti e miglioramento del limone Monachello.  
Giorn. Agric., Roma 19 : 168
- 1.940 a I portinnesti degli agrumi in relazione alla resistenza, alle malattie, all'andamento, alle condizioni -- ambientali, alle affinità d'innesto ed alle reciproche influenze con le forme. Nuov. Ann. dell'Agric., Roma, 20 : 37 - 38
- 1.940 b Il manifestarsi in natura delle infezioni di "mal secco" attraverso i "verdelli" primaverili. Boll. Real Staz. Pat. Veg. Firenze, 20 : 150 - 155
- 1.940 c Relazione sull'attività del "Posto di osservazioni sul "mal secco" degli agrumi" nel 1.940. Boll. Real Staz. Pat. Veg., Firenze, 20 : 303 - 329
- 1.941-42 Relazione sull'attività del "Posto di osservazione sul "mal secco" degli agrumi" nel 1.941 - 42. Boll. Staz Pat. Veg., Roma, 22 : 63 - 86
- 1.946 a Possibili casi di tracheovorticiliosi tra gli agrumi. Citrus, ott.-dic., 18 : 13
- 1.946 b Il "mal secco", il marciume radicale e le malattie a processo gommoso. Citrus : 15 pp.
- 1.947 Il "mal secco" fra gli agrumeti di Fondi. Giorn. -- Agric., Roma, 24
- 1.948 Fattori che condizionano e contribuiscono allo sviluppo del "mal secco" degli agrumi e metodi di lotta contro il medesimo. Ann. sperim. Agrar. Roma., 2 nov. ser.: 51 p.
- 1.949 a L'attuale problema del "mal secco" degli agrumi nelle sue immediate finalità pratiche. Ann. sperim. Agrar. Roma. 3 : 25 - 32
- 1.949 b Difesa e ricostituzione degli agrumeti colpiti dal "mal secco". Atti uff. Convegno Reg. Agrumicol., Messina, 10 - 16.

- 1.953 a La lotta contro il "mal secco" degli agrumi. Giorn. Agric., Roma, 30
- 1.953 b Periodicità nelle infezioni di "mal secco" e fondamentali orientamenti di lotta. Giorn. Agric. Roma, 34 : 8
- 1.953 c Portinnesto resistente al "mal secco". Giorn. Agricoltura, 44 : 7
- 1.953 d Contributo ad una lotta defficile: portinnesto resistente al "mal secco". Giorn. Agric. Roma. 63: 111
- 1.953 e Il "mal secco" degli agrumi. Terra e Sole. Roma 134 : 371 : 374
- 1.954 Nuovi aspetti della lotta contro il "mal secco" degli agrumi. Inform. Fitopat. 20
- 1.956 "Mal secco" degli agrumi e attuali mezzi di lotta. Riv. Agrumicol. Acireale, 1 : 201 - 206

RUGGIERI, G. e GOIDANICH, G.

- 1.953 Il "mal secco" degli agrumi. G. Agric., 3 : 14

RUSSO, F.

- 1.956 Un nuovo e promettente portinnesto per il limone: Citrus Volkameriana Pasqu. altamente resistente alla D. tracheiphila Petri ed alle Phytophthorae. Riv. Agrumicol., Acireale, 1 : 207 - 223
- 1.959 Ulteriore contributo di esperienze sul comportamen-  
te del Citrus Volkameriana Pasq. quale portinnesto  
del limone. Tecnica Agric., 11 : 423 : 427
- 1.970 Miglioramento genetico e scelta del materiale di pro-  
pagazione. In "Tutto sugli agrumi". Istituto di Tec-  
nica e Propaganda Agraria. Roma, : 75 - 82

SALERNO, M

- 1.959 Su alcuni gravi danni in piante di limone con l'intervento di Fusarium latericum NEES (Gibberella bacata (WALLR.) SACC). Tecnica Agricola, Catania 11 : 464 - 475
- 1.964 a Il problema dell'Arancio amaro, come potinnesto in agrumicoltura, alla luce di alcune osservazioni sull'incidenza di malattie crittogamiche e virosiche. Atti su la propagazione delle specie legnose, 26 - 27 - 28 novembre, : 709 - 13
- 1.964 b Ricerche sul "mal secco" degli Agrumi (D tracheiphila Petri) I. Influenza della temperatura sulla crescita del fungo, sulla produzione dei picnidi e sulla germinazione dei picnoconidi. Riv. Pat. veg., Pavia, Ser 3, 4 : 289 - 299
- 1.965 Il problema dell'arancio amaro, come portinnesto in agrumicoltura, alla luce di alcune osservazioni l'incidenza di malattie crittogamiche e virosiche. Atti delle Giornate di studio sui problemi della propagazione delle specie legnose. Pisa 26 - 28 novembre 1.964, : 709 - 713

SALERNO, M. e CARTIA, G.

- 1.965 Ricerche sul "mal secco" degli Agrumi (D tracheiphila Petri). III. Prove "in vitro" e "in vivo" sull'efficacia di alcuni anticriptogamici. Riv. Patol. veg. Ser. IV, 1 : 71 - 82
- 1.967 Ricerche sul "mal secco" degli agrumi (D tracheiphila Petri) VII. Prove di campo sull'efficacia di alcuni anticrittogamici. Tanc. agric. 19 : 168 - 175

SALERNO, M. e CATARA, A.

- 1.967 Ricerche sul "mal secco" degli agrumi (D tracheiphila

la Petri). IV. Comportamento parassitario del fungo in ospiti diversi dagli agrumi. Tecnica Agric., Catania, 19, 4 : 290 - 297

- 1.967 b Ricerche sul "mal secco" degli Agrumi (D. tracheiphila Petri) VI. Indagini sulla riproduzione sperimentale della malattia. Riv. Patol. veg., Pavia, Ser. 4, 3 : 89 - 97

SALERNO, M., CUTULI, G., e SOMMA, V.

- 1.967 "Mal secco" degli agrumi in Italia. Brevi richiami al passato, l'attuale attività di ricerca, orientamenti per il futuro. Estratto da L'Italia agricola, anno 113:96-103

SALERNO, M., EVOLA, C. e SOMMA, V.

- 1.971 Modificazioni del metabolismo fenolico e "mal secco" degli agrumi in semenzali di 'Arancio amaro' con precedenti infezioni da virus Phytopathol Mediterranea, 10 : 195 - 201

SALERNO, M., PACETTO, M. e CATARA, A.

- 1.967 Ricerche sul comportamento di Citrus volkameriana Pasq. alle infezioni di D. tracheiphila Petri e osservazioni sulla suscettibilità ad altre malattie. Tecnica agricola, Catania, 19 : 228 - 237

SALERNO, M. e PERROTA, G.

- 1.965 Ricerche sul "mal secco" degli Agrumi (D. tracheiphila Petri) V. Virulenza e caratteri culturali del fungo in Sicilia. Riv. Patol. veg., Univ. Catania, Vol II, Sez IV : 303-312.

SALERNO, M., e SOMMA, V.

- 1.971 Osservazioni sulla sistemicità del Benomyl in Sour Orange seedlings and results of trials against Citrus "mal secco". Phytopath. Mediterranea, 10 : 99 - 106

SALERNO, M., SOMMA, V. e EVOLA, C.

- 1.970 Influenza di alcune virosi sul decorso del "mal secco" degli Agrumi e primi risultati relativi al contenuto fenolico delle tesi a confronto. Phytopath. Mediterranea 9 : 22 - 28

SAREJANNI, J. A.

- 1.935 Le "mal secco" en Grèce. Ann. Inst. Phytopath. Benaki, 1 : 61 - 66
- 1.939 Catalogue commenté des champignons rencontrés sur les plantes cultivées en Grèce Ann. Inst. Phytopath. Benaki. Athènes, 3 : 54

SAREJANNI, J. A., DEMETRIADEZ, S. D. e ZACHOS, D. G.

- 1.952 Rapport sommaire sur les principales maladies des plantes observées en Grèce au cours de l'année 1.951. Ann. Inst. Phytopath. Benaki, 6 : 5 - 9

SAVASTANO, L.

- 1.921 Sulla gommosi secco o "mal secco" degli agrumi Boll. Real. Staz. sper. Frutt. Agrum. Acireale, 42 :
- 1.923 Delle epidemie italiane del "mal secco" negli agrumeti albicoccheti, ficheti, noceti e gelseti. Studio di clinica arborea. Ann. Real. Staz. sper. Frutt. Agrum. Acireale, 7 : 89 - 170

SAVASTANO, G. e FAWCETT, H.S

- 1.931    Ricerche sperimentali sul decorso patologico del "mal secco" del limone. Ann. Real. Staz. sperim. Frutt. -- Agrum. Acireale, 11 : 1 - 37

SCARAMUZZI, G.

- 1.965 a    Alcune recenti ricerche sul "mal secco" degli agrumi (D. tracheiphila Petri). Tec. agric., 17 : 227 - 234
- 1.965 b    Le malattie degli agrumi. Edizioni Agricole, Bologna, 167 pp.
- 1.970    Nuove possibilità per una lotta in campo contro il "mal secco" degli Agrumi. Inf. fitopatol. 20: 5 - 5

SCARAMUZZI, G., SALERNO, M. e CATARA, A.

- 1.964    Ricerche sul "mal secco" degli Agrumi (D. tracheiphila Petri) II Influenza delle basse temperature sul decorso della malattia. Riv. Patol. veg. Pavia, Ser 3 4 : 319 - 327, 3 tables.

SCHICKE, P. and VEEN, K.H.

- 1.969    A new systemic, CELA. W 524, with action against powdery mildew, rust and apple scab. Proc. 5th Br. Insectic. Fungic. Conf., Brighton, England : 569 - 575

SCHREIBER, L.R., and TOWNSEND, A.M.

- 1.976    Naturally occurring tolerance in isolates of Ceratocystis ulmi to Methyl 2-benzimidazole-carbamate hydrochloride, Phytopathology, 66 : 225 - 227

SCHROEDER, W.T. and PROVVIDENTI, B.

- 1.969 Resistance to Benomyl in powdery mildew of cucurbits  
Plant. Dis.Rep., 53 : 271 - 275

SCHUMAKOVA, A.A

- 1.964 Characteristics of the appearance of "mal secco" with the  
ring of lemon and their causes. Trudy vses. Inst. Zash-  
ch. Rast., 21 : 25-40.

SCHUMAKOVA, A.A et GRUBE, A.M

- 1.957 . Papel de Epicozum granulatum Penzig en el "mal se-  
cco" de los cítricos (en ruso). Acad. Lenine Sci. Agric  
22 : 33 - 39

SCRIVANI, P.

- 1.954 Patogenesi riproduzione sperimentale del "mal secco"  
da D. tracheiphila Petri, e ricerche sulla formazione  
di metaboliti tossici in coltura. Phytopath. Zeits. --  
chrift, Berlin, 22 : 83 - 108

SINITSYNA, N.V.

- 1.953 Diagnosis precoz de la enfermedad del desecamiento  
en Cítricos -"mal secco" (D.tracheiphila) Dostizh ,  
Nauki pered.Opytá sel'khoz 4:35-36 (en ruso)

SOLEL, Z. and PINKAS, J.

- 1.972 Bioassay evaluation of the systemic properties of car-  
boxin in lemon seedlings. Agric.Res., Bet Daqa Israel  
3 : 149 - 151



SOLEL, Z., PINKAS, J. and LOEBENSTEIN, G.

- 1.972 Evaluation of systemic fungicides and mineral oil adjuvants for the control of "mal secco" disease of lemon plants. Phytopathology, 62 : 1007 - 1013

SOMMA, V., FAVALORO, M., and SORCE, G.

- 1.968 Researches on Citrus "mal secco" (D. tracheiphila) VIII. Further field trials on the efficacy of some fungicides. Proceedings of the 18th Conference of the Italian Plant Protection Society, Naples, 26-28 Sept 1968: 77-83
- 1.969 Ricerca sul "mal secco" degli agrumi (D. tracheiphila Petri) VIII. Ulteriori prove di campo sull'efficacia di alcuni anticrittogamici. Notiz. Mal. Piante, 80 - 81: 77 - 83

SOMMA, V. e SALERNO, M.

- 1.973 L'influenza del Tween 20 sulla sistemicità e sulla efficacia del Benomyl contro il "mal secco" degli Agrumi. Atti Giornate Fitopatologiche : 373 - 375

SOMMA, V., SALERNO, M. e SAMMARCO, G.

- 1.974 Prove di campo sull'efficacia del Benomyl contro il "mal secco" degli Agrumi. Phytopath. Medit. 13 : 143 - 146

SPINA, P.

- 1.974 Orientamenti e direttive tecniche per il miglioramento dell'agrumicoltura italiana. L'informatore Agrario, Verona, 2 : 18

STEPANOV, K.M.

- 1.950 a The sources of infection of the "mal secco" disease of lemon trees. Doklady vsesojuz. Acad. seljisk. Nauk, 15 : 39 - 44
- 1.950 b Desecamiento infeccioso de limoneros (en ruso) Comp. Rend. Acad. Lenine Sci. Agric. Moscou, 8: 39-44

STEPANOV, K.M. and CHALICHKINA, V.I.

- 1.954 Contaminación de raíces de limoneros por D. trachei-  
phila Petri (en ruso) . Jard. Bot 39 :103-108.

STEPANOV, K.M. and SCHUMAKOVA, A.A

- 1.952 Periodos d infection en limoneros por el "mal secco" (en ruso ). Comp. Rend. Acad. Lenine Sci. Agric., Moscou, 17 : 34 - 38

THANASSOULOPOLOS, C.

- 1.969 Some preliminary investigations on the possible control of "mal secco" disease of citrus with the systemic chemical Benlate. Ann. Phytopath., 1 : 249 - 250

TOGLIANI, F.

- 1.952     Determinazione del punto isometabolico per la D. tracheiphila allevata in substrati colturali a base glucosíca. Ann. sperim. Agrar., Roma, 6 : 1153 - 1160

TOKADZE, Z.B.

- 1.971     The water regime in relation to frost and "mal secco" resistance in different citrus varieties and species. Subtropicheskie Kul'tury, 6 : 91 - 94

TRAMIER, R. e MERCIER, S.

- 1.963     Sur la presence en France d'une maladie du Citronnier: le "mal secco" D. tracheiphila Petri. Rev. Path. veg. 42 : 211 - 216

TSIKLAURI, M.S.

- 1.973     Changes in some biochemical indicators in citrus leaves of different varieties during infection by Phoma tracheiphila. Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii Gruz. SSR 24 : 312 - 316

UTURGAURI, A.I., DANELIYA, B.K., MERVALI, V.G. and KONTRIDZE, A.N.

- 1.973     The effect on phytosynthesis of substances introduced into the lemon tree. Subtrop. Kul'tury, 1 : 65 - 68

VANDERWEYEN, A.

- 1.963 La brûlure de sable (sand burn) des agrumes. Al Awamia. Rabat., 6 : 127 - 133

WARREN, C.G., SANDERS, P. and COLE, H.

- 1.974 Sclerotinia homoeocarpa tolerance to benzimidazole configuration fungicides. Phytopathology, 64 : 1139-1142

WICKS, T.

- 1.973 Control of apple scab with benomyl-oil-water emulsions. Plant.Dis.Reptr. 57 : 560 - 562

WUEST, P.J., COLE, H. and SANDERS P.L.

- 1.974 Tolerance of Verticillium dahliae to benomil. Phytopathology, 64 : 331 - 334

ZAKI, A.I. and ERWIN, D.C.

- 1.973 The effect of oil on the uptake and translocation of methyl-2-benzimidazolcarbamate and its hydrochloric acid salt in cotton. Phytopathology, 63 : 1219

